

LUCIANO FERNANDES HUERGO

REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM
Azospirillum brasilense

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientadores:

Profa. Dra. Leda Satie Chubatsu

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

CURITIBA

2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Leda Satie Chubatsu pelas excelentes aulas ministradas durante minha graduação as quais despertaram meus interesses para a área de Bioquímica e Biologia Molecular. Agradeço-a também pela orientação a qual foi fundamental não só para o andamento deste trabalho, mas também para o aprimoramento da minha formação

Ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza pela orientação, dedicação, discussões, estímulo e pela grande ajuda antes, durante e depois do meu estágio no exterior.

Agradeço ao Dr. Mike Merrick pela excelente orientação durante parte deste trabalho e pela oportunidade de compartilhar das instalações no seu laboratório. Agradeço também ao Mike e sua esposa Pam por toda atenção, dedicação e carinho durante minha estada na Inglaterra.

Ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de compartilhar das instalações do Núcleo de Fixação de Nitrogênio e também pelas sugestões e discussões. Ao Dr. Fábio e a Dra. Glaci Zancan pelo grande exemplo na luta incansável pela pesquisa e ensino neste país.

A professora Fabiane G. Rego pelo auxílio na manipulação do material radioativo.

Agradeço aos Doutores Nicholas Bird e Sean O'Rourke pelo excelente auxílio no uso do sistema de mutagênese pela técnica de "PCR-targeting".

Sou grato a todos integrantes do Núcleo de fixação de Nitrogênio pela amizade, discussões, dicas, empréstimo de material e auxílios prestados.

Aos colegas do JIC, Jeremy Thorton, Elizabeth Scanlon, Tim Fulford, Anne Durand, Alexandro Decorps, Arnould Javelle e Richard Little, pela amizade, auxílio e discussões.

Aos companheiros do Surf, em especial a turma do "Brejabreak", pela amizade e pelas ondas compartilhadas as quais contribuíram para meu bem estar e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

A coordenação do curso de pós-graduação em bioquímica e aos professores do departamento Bioquímica. Ao CNPq, a CAPES, ao programa PRONEX e a FUNPAR pelo suporte financeiro. Sou muito grato ao CNPq pela bolsa sanduíche no exterior com a qual fui contemplado. Esta bolsa foi de fundamental importância para

a realização de muitos experimentos descritos neste trabalho, para o aprimoramento de minha formação e para meu crescimento pessoal.

Aos técnicos do Núcleo de Fixação de Nitrogênio Valter de Baura e Roseli Prado e do John Innes Centre Jeremy Thorton pelo excelente trabalho no preparo do material utilizado neste trabalho e pelos ensinamentos durante meu estágio no exterior respectivamente.

À minha família, pelo amor e carinho que sempre estiveram presentes em toda minha vida. Aos meus pais Luiz Alfredo Marcondes Huergo e Sandra Fernandes Huergo, a minha irmã Franciane Fernandes Huergo Filardo pela dedicação, paciência e amor durante toda minha vida. Um agradecimento muito especial a minha querida esposa, Maria Carolina Cherchiglia Huergo, pelo apoio incondicional, compreensão, companheirismo, amor e carinho durante os últimos anos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O gênero <i>Azospirillum</i>	1
1.2 A fixação biológica de nitrogênio.....	2
1.3 Nitrogenase	4
1.4 Assimilação de amônio	6
1.5 Proteínas da família P _{II}	7
1.6 Estrutura das proteínas da família P _{II}	7
1.7 Sistema Ntr.....	8
1.8 Proteína GlnK	11
1.9 Formação de heterotrímeros	12
1.10 Moléculas efetoras das proteínas P _{II}	13
1.11 Transportadores de amônio.....	14
1.12 Família Amt	15
1.13 O gene <i>amtB</i> em <i>A. brasilense</i>	16
1.14 Substrato e estrutura das proteínas Amt.....	16
1.15 Complexo GlnK-AmtB	18
1.16 Proteínas tipo P _{II} em <i>A. brasilense</i>	20
1.16.1 A proteína GlnB.....	20
1.16.2 A proteína GlnZ.....	21
1.17 Modificação pós-traducional de GlnB e GlnZ.....	22
1.18 O gene <i>glnD</i> em <i>A. brasilense</i>	22
1.19 Sistema NtrY-NtrX	23
1.20 Organização estrutural de promotores em procariotos	25
1.20.1 Promotores do tipo σ^N	26
1.20.2 Promotores do tipo σ^{70}	26
1.21 Regulação transcricional por NtrC.....	27
1.22 Regulação transcricional da nitrogenase.....	28
1.22.1 A Proteína NifA.....	28
1.22.2 Regulação da atividade da proteína NifA.....	29
1.23 Regulação pós-traducional da nitrogenase.....	30
1.23.1 As proteínas DraT e DraG	32
1.23.2 Controle do desligamento/religamento da nitrogenase por ADP-ribosilação	33
1.23.3 Papel de proteínas P _{II} e Amt no controle do desligamento/religamento da nitrogenase por ADP-ribosilação.....	34
1.23.4 Regulação da atividade de DraT e DraG pelo estado de oxi-redução da proteína NifH	37

1.23.5 Controle de DraG por interação com proteínas de membrana ?.....	37
1.24 Promotores <i>glnBp1</i> e <i>glnBp2</i> de <i>A. brasilense</i>	38
1.25 Promotor <i>glnAp</i> de <i>A. brasilense</i>	41
1.26 Estrutura e regulação do operon <i>glnBA</i> em outros organismos	42
2. JUSTIFICATIVA.....	44
3. OBJETIVOS.....	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Bactérias e plasmídeos	46
4.2 Reagentes	48
4.3 Meios de cultura.....	49
4.3.1 Meios empregados para cultivo de <i>A. brasilense</i>	49
4.3.2 Meios empregados para cultivo de <i>E. coli</i>	50
4.4 Antibióticos.....	50
4.5 Condições de cultivo.....	51
4.6 Amplificação de DNA por PCR	51
4.7 Purificação de plasmídeo	52
4.8 Clivagem de DNA com enzima de restrição.....	52
4.9 Ligação de DNA	52
4.10 Transformação bacteriana por eletroporação.....	52
4.10.1 Preparo de células.....	52
4.10.2 Eletroporação.....	53
4.11 Transformação bacteriana por choque térmico.....	53
4.11.1 Preparo de células.....	53
4.11.2 Choque térmico.....	54
4.12 Análise de plasmídeos recombinantes	54
4.13 Eletroforese de DNA.....	54
4.14 Sequenciamento de DNA.....	55
4.15 Transferência de plasmídeos por conjugação	56
4.16 Purificação de DNA genômico de <i>A. brasilense</i>	56
4.17 Obtenção de estirpes <i>A. brasilense</i> mutante <i>ntrC</i>	57
4.18 Hibridização de DNA	59
4.18.1 Preparo da sonda	59
4.18.2 Preparo de membranas e hibridização.....	59
4.19 Determinação da atividade da nitrogenase	60
4.20 Determinação do desligamento-religamento da nitrogenase	60
4.20.1 Escala de 10mL	61
4.20.2 Escala de 110mL	61
4.21 Preparação de membrana de <i>A. brasilense</i>	61
4.22 Construção de plasmídeos.....	62
4.22.1 Construção do plasmídeo pLHFP9NTRC	62
4.22.2 Construção dos plasmídeos pLHPETDRAT, pLHPETDRAG, pLHPETDRATG e pLHPETNIFH	62
4.22.3 Construção dos plasmídeos pLHDRAThisMP, pLHDRAGhisMP e pLHDRAThisGMP.....	64
4.23 Mutagênese do promotor <i>glnBp2</i>	65
4.24 Obtenção da estirpe <i>A. brasilense</i> LFH3 (mutante <i>glnB</i> não polar)	67
4.25 Eletroforese de proteínas.....	70
4.25.1 Eletroforese sob condições desnaturante (SDS-PAGE)	70
4.25.2 Eletroforese sob condições nativas (Native-PAGE).....	72
4.26 Western Blot	72

4.26.1	Preparação de amostras para analisar a modificação da proteína NifH e GS.....	72
4.26.2	Tampões de transferência	73
4.26.3	Transferência	73
4.26.4	Tratamento da membrana	73
4.27	Expressão das proteínas DraT , DraG e NifH de <i>A. brasilense</i>	75
4.28	Purificação da proteína His-DraT de <i>A. brasilense</i>	76
4.29	Purificação da proteína His-DraG de <i>A. brasilense</i>	76
4.30	Purificação da proteína His-NifH de <i>A. brasilense</i>	77
4.31	Produção de anticorpos policlonais contra as proteínas DraT , DraG e NifH	77
4.32	Interações <i>in vivo</i> entre DraT e DraG com as proteínas P _{II} por ensaios de co-precipitação (“pull-down”)	77
4.33	Atividade de β -galactosidase	78
4.34	Dosagem de proteínas	78
5.	RESULTADOS	79
5.1	Papel da proteína NtrC no controle da expressão do operon <i>glnBA</i>	79
5.1.1	Obtenção de mutantes insercionais <i>ntrC::km</i> de <i>A. brasilense</i>	79
5.1.2	Atividade dos promotores <i>glnB</i> e <i>glnA</i> nos mutantes <i>ntrC::km</i>	81
5.2	Efeito da mutação do promotor <i>glnBp2</i> na expressão de <i>glnB</i>	82
5.3	Determinação das bases moleculares para o fenótipo das estirpes FP8 e FP9 de <i>A. brasilense</i>	83
5.3.1	Efeito da mutação do gene <i>ntrC</i> sobre a capacidade de crescimento em nitrato.....	84
5.3.2	Efeito da mutação do gene <i>ntrC</i> sobre o a atividade da nitrogenase	85
5.3.3	Efeito da mutação do gene <i>ntrC</i> sobre a expressão do operon <i>nifR3ntrBC</i>	88
5.3.4	Sequenciamento do gene <i>ntrC</i> das estirpes FP9 e FP8.....	89
5.4	Purificação e produção de anticorpos policlonais para as proteínas His-DraT, His-DraG e His-NifH.....	92
5.4.1	Purificação da proteína His-DraT	93
5.4.2	Purificação da proteína His-DraG	98
5.4.3	Purificação da proteína His-NifH	100
5.4.4	Produção de anticorpos policlonais contra as proteínas His-DraT, His-DraG e His-NifH	103
5.4	Efeito da superexpressão de His-DraT, His-DraG e His-DraT + DraG sobre o desligamento-religamento da nitrogenase.....	105
5.4.1	Complementação dos mutantes <i>draT</i> e <i>draG</i>	105
5.5	Análise da modificação e localização celular das proteínas NifH e P _{II} em resposta a um choque de amônio.	115
5.6	Efeitos da ausência da proteína GlnB na modificação pós-traducional de NifH, GS e GlnZ	118
5.7	Efeitos da ausência da proteína GlnZ na modificação pós-traducional de NifH, GS e GlnB	123
5.8	Dependência da proteína AmtB para a ligação das proteínas P _{II} à membrana citoplasmática de <i>A. brasilense</i>	125
5.9	Modificação pós-traducional da proteína NifH e inativação da nitrogenase em resposta à adição de amônio na ausência da proteína AmtB	127
5.10	Localização celular da proteína DraG após um choque de amônio.....	130
5.11	Localização celular da enzima DraG na ausência das proteínas AmtB, GlnB e GlnZ.....	133
5.12	Interação da enzima DraG com as proteínas P _{II}	134
5.13	Interação da enzima DraT com as proteínas P _{II}	137
6	DISCUSSÃO.....	139
6.1	Papel da proteína NtrC na expressão do gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i>	140

6.2 Determinação das bases moleculares para o fenótipo das estirpes FP8 e FP9 de <i>A. brasilense</i>	141
6.3 Efeito da superexpressão de His-DraT, His-DraG e His-DraT + DraG sobre o desligamento-religamento da nitrogenase.....	142
6.4 Papel das proteínas GlnB, GlnZ e AmtB na regulação de DraT e DraG.....	144
7. CONCLUSÕES.....	153
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo estrutural da nitrogenase de <i>A. vinelandii</i>	5
Figura 2 – Modelo estrutural da proteína GlnB de <i>E. coli</i> na forma trimérica	8
Figura 3 - Regulação das atividades de NtrC e glutamina sintetase em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular	10
Figura 4 – Estrutura tridimensional dos monômeros das proteínas GlnB e GlnK de <i>E. coli</i> ...	13
Figura 5 – Estrutura da proteína AmtB de <i>E. coli</i>	18
Figura 6 – Sistema Ntr em <i>A. brasilense</i>	24
Figura 7 - Modelo para ativação transcricional NtrC - dependente	28
Figura 8 – Esquema da inativação reversível de NifH por ADP-ribosilação.....	32
Figura 9 – Regulação da atividade de DraT, DraG e NifH durante o desligamento/religamento da nitrogenase.....	36
Figura 10 – Sequência da região promotora do gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i>	40
Figura 11 – Esquema da obtenção do plasmídeo pLHR3BCKm	58
Figura 12 – Esquema da construção do plasmídeo pLHDRAThisMP.....	65
Figura 13 – Estratégia utilizada para mutação no sítio <i>glnBp2</i> na região promotora do gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i>	67
Figura 14 – Fluxograma da obtenção do plasmídeo pLFH10	70
Figura 15 – Controle de reação cruzada para os anticorpos anti-GlnB e anti-GlnZ	75
Figura 16 – Perfil de hibridização dos mutantes LHNTRC3 e LHNTRC5	80
Figura 17 – Efeito da mutação do promotor <i>glnBp2</i> (σ^N) sobre a expressão do gene <i>glnB</i>	83
Figura 18 – Efeito da expressão do gene <i>ntrC</i> da estirpe FP9 no crescimento em nitrato das estirpes FP2 (selvagem) e LHNTRC5 (<i>ntrC</i>)	85
Figura 19 – Efeito da expressão do gene <i>ntrC</i> da estirpe FP9 sobre a atividade da nitrogenase nas estirpes FP2 (selvagem) e LHNTRC5 (<i>ntrC</i>)	87
Figura 20 – Modelo para a regulação da atividade dos promotores do gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> pela proteína NtrC.....	88
Figura 21 – Eletroforetograma da região contendo as mutações encontradas no gene <i>ntrC</i> das estirpes FP9 e FP8 de <i>A. brasilense</i>	90
Figura 22 – Alinhamento do domínio central de 8 ativadores de transcrição de σ^N RNA polimerase holoenzima com a proteína NtrC de <i>A. brasilense</i>	91
Figura 23 – Eletroforese dos extratos protéicos de <i>E. coli</i> BL21 (λ DE3) <i>plysS</i> expressando as proteínas His-DraT e His-DraG	94
Figura 24 – Ensaio de solubilização da proteína His-DraT	95
Figura 25 – Perfil eletroforético de frações obtidas durante a purificação da proteína His-DraT	97
Figura 26 – Perfil eletroforético das frações contendo as proteínas His-DraT e His-DraG após a purificação	98
Figura 27 – Perfil eletroforético de frações obtidas durante a purificação da proteína His-DraG	99
Figura 28 – Eletroforese da expressão e purificação da proteína His-NifH.....	102
Figura 29 – Imunodeteção das proteínas His-DraT, His-DraG e NifH	104
Figura 30 – Complementação dos mutantes <i>draT</i> e <i>draG</i> com os plasmídeos pLHDRAThisMP, pLHDRAGhisMP e pLHDRAThisGMP.....	107
Figura 31 – Regulação da atividade da nitrogenase em resposta à adição de amônio em células superexpressando His-DraT	109

Figura 32 – Estado de ADP-ribosilação da proteína NifH em resposta à adição de amônio.	111
Figura 33 – Regulação da atividade da nitrogenase em resposta à adição de amônio em células superexpressando His-DraG.....	112
Figura 34 – Regulação da atividade da nitrogenase em resposta à adição de amônio em células superexpressando His-DraT e DraG nativa.....	114
Figura 35 – Perfil de modificação das proteínas NifH, GS, GlnB, GlnZ após choque de amônio na estirpe selvagem <i>A. brasilense</i> FP2	117
Figura 36– Expressão de GS, GlnB, GlnZ e desuridililação de GlnZ nos mutantes <i>glnB</i>	120
Figura 37 – Adenililação e desadenililação de GS no mutante LFH3	121
Figura 38 – Perfil de modificação das proteínas NifH, GS e GlnZ após choque de amônio na estirpe mutante LFH3	122
Figura 39 – Perfil de modificação da proteína NifH em resposta a anaerobiose nas estirpes mutantes <i>glnB</i> , <i>glnZ</i> e <i>amtB</i>	123
Figura 40 – Perfil de modificação das proteínas NifH, GS e GlnB após choque de amônio na estirpe 7611(<i>glnZ</i>)	124
Figura 41 – As proteínas GlnB e GlnZ se ligam à fração de membrana de forma dependente de AmtB após choque de amônio.....	126
Figura 42 – Perfil de modificação das proteínas NifH, GS, GlnB e GlnZ após choque de amônio na estirpe FAJ310 (<i>amtB</i> ⁻).....	128
Figura 43 – Perfil de desligamento e modificação da nitrogenase após choque de amônio na estirpe FAJ310 (<i>amtB</i>)	129
Figura 44 – Perfil de modificação das proteínas NifH, GS, GlnB e GlnZ após choque de amônio na estirpe UB2 (pLHdraThisGMP)	131
Figura 45 – A ligação de DraG à membrana requer AmtB, GlnB e GlnZ.....	134
Figura 46 – Co-eluição das proteínas His-DraG e GlnZ na estirpe UB4 (pLHGhisMP).....	135
Figura 47 – Co-eluição das proteínas His-DraG e GlnZ na estirpe FAJ310 (pLHGhisMP) .	137
Figura 48 – DraT interage com a forma desuridililada de GlnB <i>in vivo</i>	138
Figura 49 – Modelo proposto para o controle da atividade de DraT	149
Figura 50 – Modelo para regulação das atividades das enzimas DraT e DraG em resposta a adição de amônio em <i>A. brasilense</i>	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bactérias e plasmídeos	46
Tabela 2 – Soluções para eletroforese desnaturante.....	71
Tabela 3 – Soluções para preparo do gel de empilhamento	71
Tabela 4 – Volumes das soluções para preparo do gel de separação.	71
Tabela 5 – Tampões de transferência.....	73
Tabela 6 – Anticorpos e bloqueadores.	74
Tabela 7 – Expressão das fusões <i>glnB-lacZ</i> e <i>glnA-lacZ</i> em <i>A. brasilense</i>	81
Tabela 8 – Expressão da fusão cromossomal <i>nifR3ntrBC-lacZ</i> em <i>A. brasilense</i>	89

LISTA DE ABREVIATURAS

[³² P] dCTP	=	α [³² P] 5' trifosfato de 2' desoxicitidina
ADP	=	5' difosfato de adenosina
Amp ^r	=	resistência a ampicilina
Apra ^r	=	resistência a apramicina
ATase	=	enzima adenililtransferase
ATP	=	5' trifosfato de adenosina
D.O.	=	densidade óptica
dATP	=	5' trifosfato de 2' desoxiadenina
dGTP	=	5' trifosfato de 2' desoxiguanidina
DMSO	=	dimetilsulfóxido
DNA	=	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	=	5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo
DraG	=	dinitrogenase redutase glicohidrolase
DraT	=	dinitrogenase ADP-ribosil transferase
DTT	=	ditiotreitól
dTTP	=	5' trifosfato de 2' desoxitimidina
e ⁻	=	elétron
EDTA	=	ácido etilenodiamino-tetra ético
GDH	=	glutamato desidrogenase
GLN	=	glutamina
GlnB-UMP	=	proteína GlnB uridililada
GlnZ-UMP	=	proteína GlnZ uridililada
GLU	=	glutamato
GOGAT	=	glutamato sintase
GS	=	glutamina sintetase
GS-AMP	=	proteína GS adenililada
IPTG	=	β-D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
kΩ	=	quilo ohms
kb	=	quilobase
Km ^r	=	resistência a canamicina
kV	=	quilo volts
L	=	litro
m/v	=	massa por volume
Mpb	=	mega pares de base
N ₂ ase	=	nitrogenase
NAD ⁺	=	nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	=	nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NADP ⁺	=	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADPH	=	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NaI ^r	=	resistência a ácido nalidíxico
NifH-ADPR	=	proteína NifH-ADP-ribosilada
NtrC-P	=	proteína NtrC fosforilada
ORF	=	seqüência potencial para codificação de proteína
pb	=	pares de base
PCR	=	reação em cadeia da polimerase
PEG	=	polietileno glicol

Pi	=	fosfato inorgânico
PMSF	=	α -toluenosulfonil fluoreto
RBS	=	sítio de ligação para ribossomo
RNA	=	ácido ribonucleico
rpm	=	rotação por minuto
SDS	=	dodecilsulfato de sódio
Sm ^r	=	resistência a estreptomicina
TAE	=	tampão Tris-acetato-EDTA
Tc ^r	=	resistência a tetraciclina
tris	=	Tris(hidroximetil)-aminometano
U	=	unidade enzimática
UAS	=	seqüência ativadora a montante
UMP	=	5' monofosfato de uracila
UTase	=	enzima uridililtransferase

RESUMO

Azospirillum brasilense é uma bactéria fixadora de nitrogênio que se associa com diversas plantas de interesse agrícola como milho e trigo, portanto, tem um potencial como biofertilizante. Neste trabalho vários aspectos da regulação do metabolismo de nitrogênio nesta bactéria foram estudados. Em *A. brasilense* o gene *glnB*, que codifica para a proteína GlnB, é expresso a partir de duas regiões promotoras distintas, *glnBp1* - σ^{70} e *glnBp2* - σ^N , porém, o mecanismo pelo qual estes promotores são regulados ainda não é conhecido. A expressão do gene *glnB* foi estudada utilizando fusões *glnB-lacZ*. A expressão de *glnB* em mutantes *ntrC* de *A. brasilense* foi diferente da observada na estirpe selvagem. Este resultado, juntamente com dados obtidos anteriormente, sugere que a proteína NtrC regula a expressão do gene *glnB* ativando a transcrição a partir do promotor *glnBp2* - σ^N e reprimindo a transcrição a partir do promotor *glnBp1* - σ^{70} . As estirpes mutantes de *A. brasilense* FP8 e FP9, obtidas por mutagênese química, apresentam um fenótipo Nif⁻ (não fixam nitrogênio) e são incapazes de utilizar nitrato como fonte única de nitrogênio, as bases moleculares para estes fenótipos foram investigadas neste trabalho. O sequenciamento do gene *ntrC* das estirpes FP8 e FP9 indicou trocas únicas de nucleotídeos que levam a alterações de aminoácidos no motivo de ligação de ATP da proteína NtrC. Estas mutações geram proteínas que não são capazes de ativar a transcrição de promotores tipo σ^N mas que ainda apresentam capacidade de se ligar ao DNA. Estas características explicam o fenótipo Nif⁻ observado nas estirpes FP8 e FP9, o qual difere dos mutantes insercionais NtrC que apresentam um fenótipo parcial para fixação de nitrogênio. A fixação de nitrogênio em algumas bactérias é controlada pós-traducionalmente por mono-ADP-ribosilação da enzima dinitrogenase redutase (NifH) que ocorre em resposta a adição de amônio ao meio extracelular. Este processo é mediado pela enzima DraT e revertido pela enzima DraG sendo que a atividade destas enzimas também é controlada pós-traducionalmente pelos níveis de nitrogênio da célula. Proteínas da família P_{II} parecem estar envolvidas no controle destas enzimas, mas o mecanismo pelo qual tal controle pode ocorrer permanece desconhecido. Os resultados aqui descritos mostram que as proteínas P_{II} (GlnB e GlnZ) e DraG se associam à fração de membrana após um choque de amônio em *A. brasilense*, a ligação destas proteínas

à membrana e a ADP-ribosilação de NifH não ocorre em um mutante *amtB*. A enzima DraG interage com a proteína GlnZ *in vivo* de forma independente dos níveis de nitrogênio celular, enquanto que a enzima DraT interage com a proteína GlnB *in vivo* apenas após um choque de amônio. Estes dados sugerem que a atividade de DraG seja controlada negativamente pela interação com a membrana induzida por amônio através de um complexo ternário envolvendo DraG, GlnZ e AmtB. A ligação de DraG à membrana separaria a enzima DraG de seu substrato citoplasmático, a proteína NifH modificada, impedindo o processo de remoção do grupo ADP-ribose de NifH. Estas observações indicam que a proteína AmtB pode ser capaz de seqüestrar não só proteínas da família P_{II} mas também proteína a elas complexadas para a membrana celular, também identificam a proteína DraG como novo alvo de ligação a proteínas da família P_{II}, além de sugerir um modelo para o controle da ADP-ribosilação da proteína NifH que provavelmente pode ser aplicado a outros organismos que exibem tal regulação da nitrogenase

ABSTRACT

Azospirillum brasilense is a nitrogen-fixing bacterium found in association with important agricultural crops such as maize and wheat, and thus has potential as a nitrogen biofertilizer. In this work we have studied several aspects of the regulation of the nitrogen metabolism in this bacterium. In *A. brasilense* the *glnB* gene, coding for the P_{II} protein GlnB, is expressed by two different promoters, *glnBp1* - σ^{70} and *glnBp2* - σ^N , the mechanism by which these promoters are regulated remains unknown. We have investigated the expression of *glnB* using *glnB-lacZ* gene fusions, expression of *glnB* in *A. brasilense ntrC* mutant differed from that in the wild-type strain. This result, together with our previous data, indicates that the NtrC protein regulates directly *glnB* expression by enhancing transcription from *glnBp2* - σ^N and repressing transcription from *glnBp1* - σ^{70} . The *A. brasilense* mutant strains FP8 and FP9 were selected after nitrosoguanidine treatment, showed a null Nif phenotype and were unable to use nitrate as sole nitrogen source, the molecular basis of these phenotypes were investigated. Sequencing of the FP8 and FP9 *ntrC* genes revealed single nucleotide mutations leading to amino acid substitution on the NtrC nucleotide-binding site, this mutations lead to proteins that can not activate σ^N -dependent promoter but are still able to bind to the DNA. These mutations explain the null Nif phenotype observed in the previously isolated *A. brasilense* mutants FP8 and FP9, which are different from that of insertional-NtrC mutants that show partial nitrogenase activity. Nitrogen fixation in some diazotrophic bacteria is regulated at the post-translational level by mono-ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase (NifH) that occurs in response to addition of ammonium to the extracellular medium. This process is mediated by DraT enzyme and reversed by DraG enzyme, the activities of both these enzymes being themselves regulated according to the cellular nitrogen status. P_{II} proteins have been implicated in the regulation of the activities of DraT and DraG. However the precise mechanism by which this regulation occurs has so far not been determined. We have now shown in *A. brasilense* that the P_{II} proteins (GlnB and GlnZ) and DraG were all membrane associated after an ammonium shock, and both this membrane sequestration and ADP-ribosylation of NifH were defective in an *amtB* mutant. We have also shown that DraG interacts with GlnZ *in vivo* independently of cellular nitrogen levels, whilst DraT interacts with GlnB *in vivo* only after an ammonium shock.

These results indicate that DraG activity is regulated by ammonium induced membrane sequestration through a ternary protein complex involving DraG, GlnZ and AmtB. The membrane sequestration of DraG physically separates it from the substrate (modified NifH) thus impairing the ADP-ribosyl removing process. Our observations identify a novel role for an ammonia channel (Amt) protein in the regulation of bacterial nitrogen metabolism by mediating membrane sequestration of a protein other than a P_{II} family member, they identify DraG as a new target of the PII protein family and they also suggest a model for control of ADP-ribosylation that is likely to be applicable to all diazotrophs that exhibit such posttranslational regulation of nitrogenase.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Azospirillum*

As bactérias do gênero *Azospirillum* são microrganismos capazes de crescer utilizando nitrogênio atmosférico como fonte única de nitrogênio (diazotróficos), aeróbios, que se associam com raízes de diversas plantas de importância agrícola como o milho, trigo, sorgo e arroz (DÖBEREINER e DAY, 1976; DÖBEREINER, 1991; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; ECKERT *et al.*, 2001). Algumas estirpes podem colonizar não só a rizosfera mas também o interior de raízes (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Estas bactérias já foram isoladas de raízes de mais de 100 espécies de plantas, podendo também ser aplicadas com sucesso a raízes de plantas que não apresentam histórico de colonização com *Azospirillum* (BASHAN *et al.*, 2004). Bactérias deste gênero são classificadas como colonizadores de raízes de ampla faixa hospedeira (BASHAN e HOLGUIN, 1997). *Azospirillum* spp. são bactérias Gram negativas, curvas, móveis e de várias origens geográficas. A temperatura ótima de crescimento varia entre 28 e 41°C, dependendo da espécie (ECKERT *et al.*, 2001).

O gênero *Azospirillum* pertence à subdivisão α das Proteobactérias (YOUNG, 1992) e comporta oito espécies: *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum* (TARRAND *et al.*, 1978), *Azospirillum halopraeferans* (REINHOLD *et al.*, 1987), *Azospirillum amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983), *Azospirillum irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989), *Azospirillum largimobile* (DEKHIL *et al.*, 1997), *Azospirillum doebereinae* (ECKERT *et al.*, 2001) e *Azospirillum oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005). Dentre estas espécies, a mais estudada é *A. brasilense*. Análise com diversas bactérias do gênero indica que possuem um genoma complexo, com cinco a sete megareplicons variando de 0,65 a 2,6 Mpb. Diversos megareplicons mostraram sinal de hibridização com o gene rDNA 16S, o que sugere a presença de múltiplos cromossomos nesta bactéria (MARTIN-DIDONET *et al.*, 2000)

As fontes de carbono preferencialmente utilizadas por *Azospirillum* spp. são ácidos orgânicos como malato, lactato, succinato e piruvato. Carboidratos como D-frutose e D-glucose podem ser utilizados por algumas espécies (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987). O metabolismo de nitrogênio é bastante versátil, podendo ser utilizados como fonte de nitrogênio: amônio, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio atmosférico (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987; STEENHOUDT e

VANDERLEYDEN, 2000). Todas as espécies de *Azospirillum* são diazotróficas, quando cultivadas em meio semi-sólido isento de nitrogênio fixado formam uma película de crescimento característica (DÖBEREINER e DAY, 1976). Esta película é formada por células que se deslocam para regiões do meio onde a concentração de oxigênio é compatível com a síntese e atividade da nitrogenase (DÖBEREINER e DAY, 1976).

Um aumento significativo no rendimento da produção de grãos é observado com a inoculação de *Azospirillum* spp., juntamente com um aumento no conteúdo de fósforo, potássio e de nitrogênio total das plantas (BASHAN e HOLGUIN, 1997; STEENHOUTD e VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN *et al.*, 2004). O aumento na produção e crescimento após a inoculação com estirpes de *Azospirillum* spp. tem sido atribuído principalmente a um efeito geral no crescimento das raízes e uma conseqüente melhora na capacidade de assimilação de nutrientes pela planta (KAPULNIK *et al.*, 1985; BASHAN e HOLGUIN, 1997). A teoria mais aceita é de que o efeito benéfico da associação com *Azospirillum* ocorra devido a uma soma de múltiplos mecanismos (BASHAN *et al.*, 2004). As bactérias do gênero *Azospirillum* podem produzir vários fitormônios (tais como giberilinas, ácido indolacético e etileno) e fixam nitrogênio em associação com plantas, porém a transferência de nitrogênio fixado para a planta associada parece ser limitada e nem sempre é detectada (BASHAN *et al.*, 2004). BECKER e colaboradores (2002) demonstraram que plantas de tomate, crescidas em meio livre de nitrogênio fixado, e inoculadas com *A. brasilense* são capazes de induzir a expressão de um gene envolvido no transporte de amônio no tomateiro. Este resultado não foi observado quando o mesmo experimento foi conduzido com uma estirpe de *A. brasilense* incapaz de fixar nitrogênio, sugerindo que o amônio produzido pela bactéria pode ser sensoriado e, possivelmente, utilizado pela planta associada como fonte de nitrogênio.

O mecanismo exato da interação planta-*Azospirillum* spp. não é conhecido. Acredita-se que a adesão do *A. brasilense* a rizosfera ocorra em duas etapas distintas: uma etapa inicial reversível mediada pelo flagelo polar, seguida de uma etapa irreversível de aderência mediada por polissacarídeos secretados pela bactéria (STEENHOUTD e VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN *et al.*, 2004).

1.2 A fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento necessário para a síntese de proteínas, ácidos

nucléicos e outras biomoléculas sendo, portanto, fundamental para manutenção da vida neste planeta. O gás dinitrogênio, N_2 , é a forma mais abundante deste elemento e constitui 80% da atmosfera da Terra, entretanto nenhum eucarioto é capaz de utilizá-lo diretamente (POSTGATE, 1982). A fixação biológica de nitrogênio é o processo pelo qual o N_2 é transformado a NH_3 , forma metabolicamente utilizável. As chamadas bactérias diazotróficas são os únicos organismos que podem converter o dinitrogênio atmosférico a amônio, o qual pode ser utilizado na síntese de biomoléculas que contenham nitrogênio (BURRIS, 1991). A capacidade de fixar nitrogênio é encontrada na maioria dos grupos filogenéticos entre as bactérias, incluindo sulfo-bactérias, firmibactéria, actinomicetos, cianobactérias, proteobactérias e arqueobactérias (DIXON e KAHN, 2004).

O elemento nitrogênio é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento de plantas (DIXON e KAHN, 2004), é também o mais caro dos fertilizantes agrícolas (PEDROSA, 1987). Os vegetais são incapazes de utilizar nitrogênio atmosférico diretamente, mas podem obter nitrogênio fixado através de microrganismos que convertem o nitrogênio atmosférico a amônio ou através de fertilizantes nitrogenados. O uso de fertilizantes nitrogenados, além de elevar os custos da produção agrícola, pode gerar danos ecológicos, uma vez que cerca de 50% do total aplicado são usualmente perdidos por ação de chuvas, erosão e atividade bacteriana (PEDROSA, 1987). Os danos ao ambiente causados pelo uso de fertilizantes nitrogenados incluem eutrofização de rios e lagos, acidificação do solo e emissão de óxidos de nitrogênio na atmosfera (DIXON e KAHN, 2004). Além do efeito direto no solo a produção de fertilizantes a base de nitrogênio demanda uma grande quantidade de energia, normalmente provida por combustíveis fósseis, aumentando a emissão de dióxido de carbono na atmosfera.

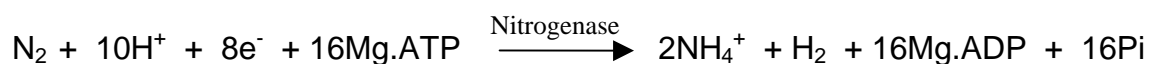
No Brasil, uma substancial economia em fertilizantes nitrogenados é decorrência do uso da simbiose entre a soja e a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*. Acredita-se que esta bactéria seja responsável pela produção de 90 a 200 quilos de nitrogênio fixado por hectare/ano (PEDROSA, 1987). O nitrogênio fornecido pelo processo de fixação biológica é menos propenso a lixiviação e volatilização já que ele é utilizado *in situ*, sendo assim, o processo biológico é uma alternativa barata, limpa e sustentável para o fornecimento de nitrogênio na agricultura comercial.

As bactérias do gênero *Azospirillum*, têm um grande potencial de uso como biofertilizante, face à capacidade que possuem de colonizar raízes de várias

espécies de plantas, sua ampla distribuição geográfica e sua eficiência na fixação de nitrogênio *in vitro* (PEDROSA, 1987). Com o conhecimento das vias metabólicas envolvidas no controle do metabolismo de nitrogênio em *A. brasilense*, seria possível utilizar técnicas de biologia molecular para alterar genes que codificam proteínas regulatórias. Tais mutantes poderiam fixar nitrogênio de forma constitutiva e, eventualmente, secretar amônio para a planta associada tornando dispensável o uso de fertilizantes nitrogenados (PEDROSA, 1987).

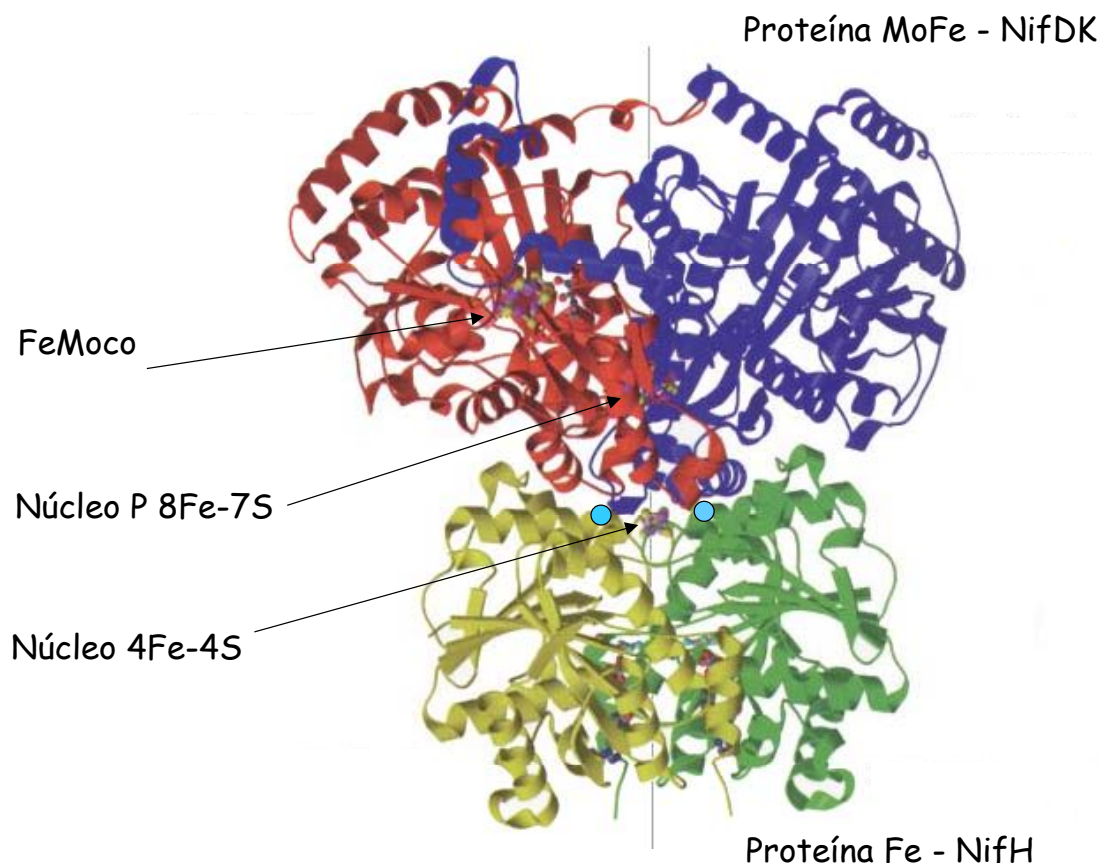
1.3 Nitrogenase

A nitrogenase é a enzima responsável pela fixação biológica de nitrogênio. Esta enzima catalisa a redução do dinitrogênio gasoso (N₂) a amônio como mostra a seguinte reação (EADY, 1986; POSTGATE, 1982):



O complexo da nitrogenase geralmente é composto de duas proteínas: a dinitrogenase redutase, proteína Fe (contém ferro) ou NifH e a dinitrogenase, proteína Fe-Mo (contém ferro e molibdênio) ou NifDK. A proteína NifH é um dímero γ_2 (produto do gene *nifH*), contém um núcleo 4Fe-4S e sua função é transportar elétrons até a proteína NifDK que, por sua vez é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ (produto dos genes *nifDK*) contendo dois grupos prostéticos: 2 centros P e 2 cofatores ferro molibdênio (FeMo) (BURRIS, 1991). Os componentes da nitrogenase são extremamente sensíveis ao oxigênio devido a seus grupos metálicos que estão expostos ao solvente. Um modelo estrutural do complexo nitrogenase de *Azotobacter vinelandii* está apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Modelo estrutural da nitrogenase de *A. vinelandii*



Modelo estrutural do complexo nitrogenase de *A. vinelandii* (SCHINDELIN *et al.*, 1997). As duas subunidades idênticas (γ_2) da proteína dimérica NifH (proteína Fe) estão representadas em amarelo e verde. Apenas duas subunidades da proteína NifDK (proteína FeMo) estão representadas em vermelho (α) e azul (β). As setas indicam os núcleos metálicos presentes na nitrogenase. As esferas em azul indicam a posição do resíduo de Arginina 100 que corresponde ao resíduo de Arginina 101 de *A. brasilense*.

Além dos genes *nifHDK* a biossíntese e funcionamento do complexo da nitrogenase requer os produtos de outros genes necessários para o transporte de elétrons, regulação transcricional, biossíntese de cofatores e transporte de íons (DIXON e KAHN, 2004). Em vista do alto gasto energético envolvido na redução do N_2 a NH_3 , o processo de fixação de nitrogênio é altamente regulado tanto na atividade da nitrogenase como na expressão de seus genes (POSTGATE, 1982).

Apesar de ainda não completamente definido existe um certo consenso sobre

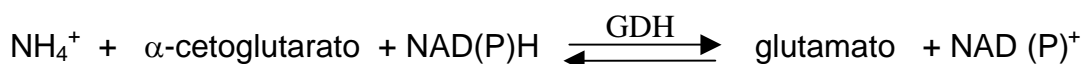
a seqüência de eventos que ocorrem no ciclo catalítico da nitrogenase, este mecanismo é baseado em dados obtidos principalmente com as nitrogenases de *Klebsiella pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii*. A proteína NifH contendo a forma reduzida do núcleo metálico $[Fe_4S_4]$ (+1), liga duas moléculas de MgATP (ASHBY e THORNELEY, 1987). A ligação do MgATP altera a estrutura de NifH e altera o potencial de oxi-redução do núcleo $[Fe_4S_4]$ promovendo sua associação com a proteína NifDK. Com a formação do complexo NifH – NifDK ocorre a transferência de um elétron da NifH para o cofator FeMo da proteína NifDK (LOWE *et al.*, 1993). Concomitante a transferência de elétron ocorre a hidrólise das duas moléculas de MgATP ligadas a NifH, fosfato inorgânico é liberado e a proteína NifH oxidada fica ligada a MgADP, o complexo NifH – NifDK é quebrado. Para completar o ciclo, a NifH oxidada é novamente reduzida por um doador de elétrons (uma ferredoxina ou flavodoxina), as duas moléculas de MgADP são trocadas por MgATP. O ciclo catalítico é repetido até que um número suficiente de elétrons seja transferido para que a proteína NifDK reduza seu substrato (HAGEMAN e BURRIS, 1978).

1.4 Assimilação de amônio

O amônio obtido pelo processo de fixação de nitrogênio ou captado do meio externo é utilizado na síntese de glutamina e glutamato, os quais servem como doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). A assimilação de amônio por microrganismos pode ocorrer por duas vias, uma envolvendo a ação seqüencial das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (MERRICK e EDWARD, 1995; ARCONDÉGUY *et al.*, 2001):



e outra envolvendo a enzima glutamato desidrogenase (GDH):



A primeira via (GS – GOGAT) é a principal responsável pela assimilação de

amônio em condições limitantes deste composto. A segunda via (GDH) funciona quando a concentração de amônio é alta, pois a GDH possui uma afinidade relativamente baixa para NH_4^+ (MERRICK e EDWARD, 1995). Em *A. brasilense* a via GS-GOGAT é a via predominante de assimilação de amônio independente da fonte de nitrogênio utilizada para crescimento (WESTBY *et al.*, 1987). A GS é uma enzima dodecamérica e tem sua atividade controlada pela adição covalente de um grupamento adenilil a cada uma de suas subunidades (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001).

1.5 Proteínas da família P_{II}

Em todas as células, as vias de utilização de nitrogênio têm que ser reguladas para evitar perda desnecessária de energia e maximizar a utilização do nitrogênio disponível. O conhecimento dos sistemas de controle do metabolismo de nitrogênio varia de organismo para organismo. Em *E. coli* proteínas da família P_{II} têm um papel fundamental na coordenação das vias do metabolismo de nitrogênio.

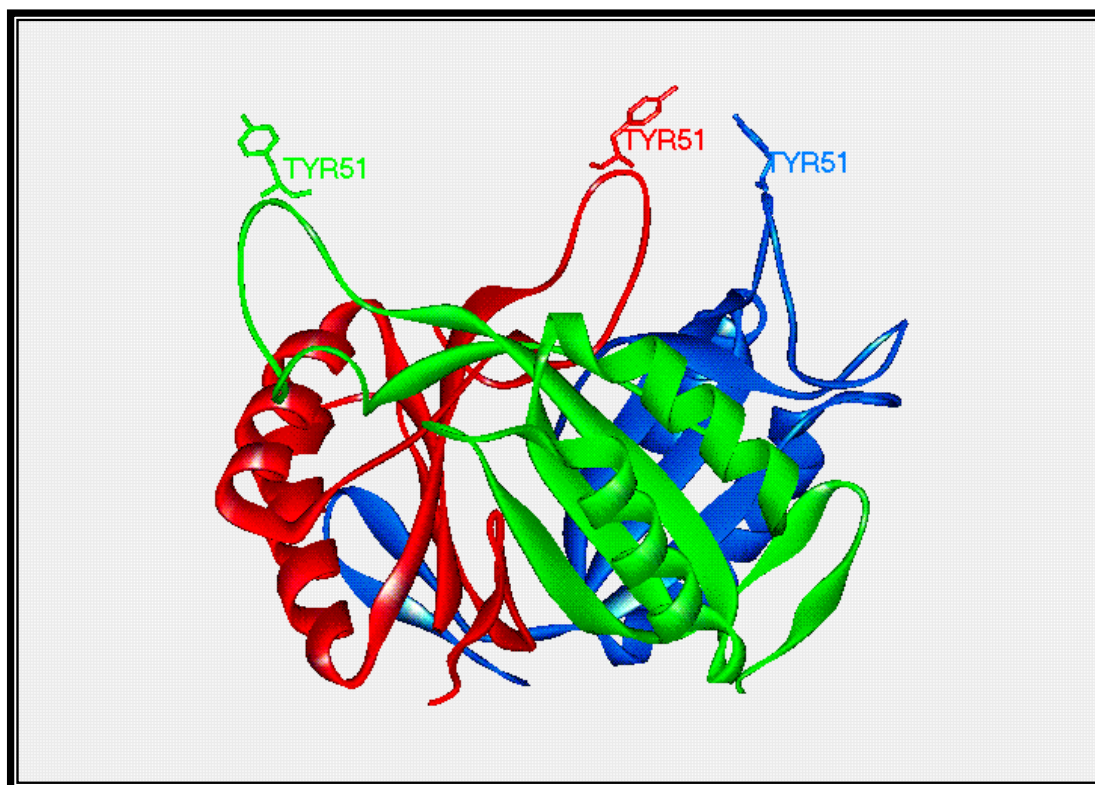
Proteínas da família P_{II} são proteínas transdutoras dos níveis de nitrogênio intracelular. Estas proteínas estão presentes na maioria das bactérias, sendo encontradas em membros de todas as subdivisões das proteobactérias, firmibactérias, actinomicetos, arqueobactérias e cianobactérias. A maioria das bactérias que não codifica para uma proteína da família P_{II} são organismos patogênicos os quais passaram por um processo de redução do genoma devido ao tipo de ambiente que habitam (ARCONDEGUY *et al.*, 2001). Mais recentemente proteínas da família P_{II} têm sido encontradas em algas e plantas, mas até o momento não foram reportadas em fungos ou animais.

1.6 Estrutura das proteínas da família P_{II}

A proteína GlnB de *E. coli*, como todas as proteínas da família P_{II}, é uma proteína trimérica onde cada uma das subunidades contém três estruturas em volta: loop-T, loop-B e loop-C. O trímero forma uma estrutura em barril de 30Å de altura com cada monômero de 12kDa dispostos de forma que uma região flexível não estruturada da proteína de aproximadamente 18 resíduos, conhecida como loop-T (CARR *et al.*, 1996) (Figura 2). A principal característica das proteínas tipo P_{II} em proteobactérias é sua capacidade de ser covalentemente modificada por uridililação no resíduo de tirosina 51 localizado no loop-T de cada monômero. A modificação covalente da proteína P_{II} varia de acordo com os níveis de nitrogênio intracelular,

ambas as formas de P_{II} (livre ou uridililada) podem interagir com diversas proteínas receptoras modulando suas atividades. A cascata de interações das proteínas da família P_{II} com seus receptores em *E. coli* é conhecida como sistema Ntr “nitrogen regulation system”.

Figura 2 – Modelo estrutural da proteína GlnB de *E. coli* na forma trimérica



As três subunidades da proteína estão destacadas em diferentes cores. O resíduo de tirosina 51 na volta T está indicado (TYR51) (CARR *et al.*, 1996).

1.7 Sistema Ntr

O sistema de regulação de nitrogênio (Ntr) foi inicialmente descrito em bactérias entéricas como *E. coli*, e *Klebsiella pneumoniae*. Este sistema regula a utilização de fontes alternativas de nitrogênio como nitrato e aminoácidos (MERRICK e EDWARDS, 1995). Em *E. coli* este sistema foi inicialmente descrito com seis proteínas: NtrB, NtrC, UTase/UR (GlnD), P_{II} (GlnB), ATase (GlnE) e glutamina sintetase (GS ou GlnA). (MERRICK e EDWARDS, 1995). A descoberta de uma segunda proteína da família P_{II} (GlnK) em *E. coli* e em outros microrganismos aumentou a complexidade do sistema. Para facilitar a compreensão, o papel da

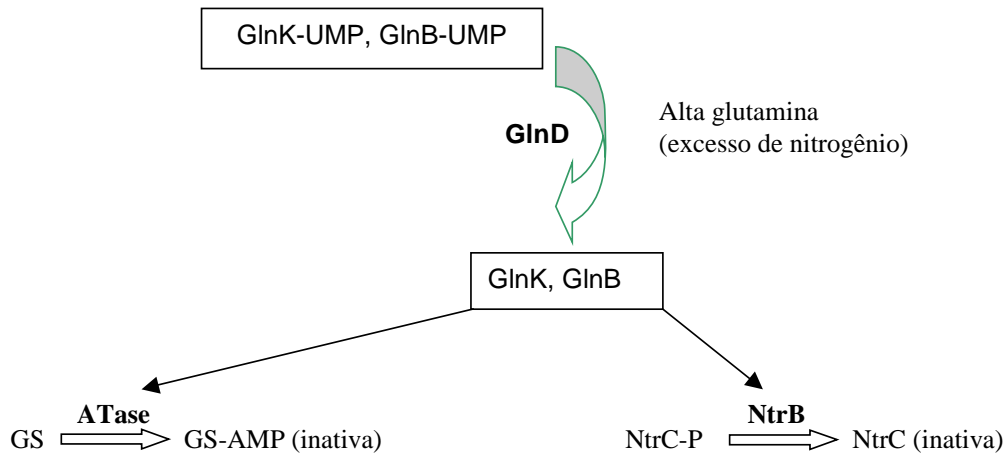
proteína GlnB será inicialmente discutido, a função da proteína GlnK no sistema Ntr será considerada posteriormente.

O sistema Ntr consiste em uma cascata regulatória, onde a proteína GlnB tem um papel principal, controlando a atividade de outras proteínas de acordo com os níveis de nitrogênio (glutamina) intracelular. Em condições limitantes de nitrogênio a concentração de glutamina intracelular é baixa, a proteína UTase/UR (GlnD) tem sua atividade de uridilil transferase estimulada e catalisa a adição de um grupamento UMP à proteína GlnB (BROWN *et al.*, 1971; ADLER, *et al.*, 1975; BLOOM *et al.*, 1978; ENGLEMAN e FRANCIS, 1978; KAMBEROV *et al.*, 1994; JIANG *et al.*, 1998a; JIANG *et al.*, 1998b; JIANG *et al.*, 1998c). GlnB uridililada não consegue se ligar à proteína NtrB que, na forma livre catalisa a fosforilação da proteína NtrC, ativando-a (ATKINSON *et al.*, 1994; JIANG e NINFA, 1999). NtrC fosforilada irá ativar a transcrição de genes envolvidos na assimilação de fontes alternativas de nitrogênio (Figura 3).

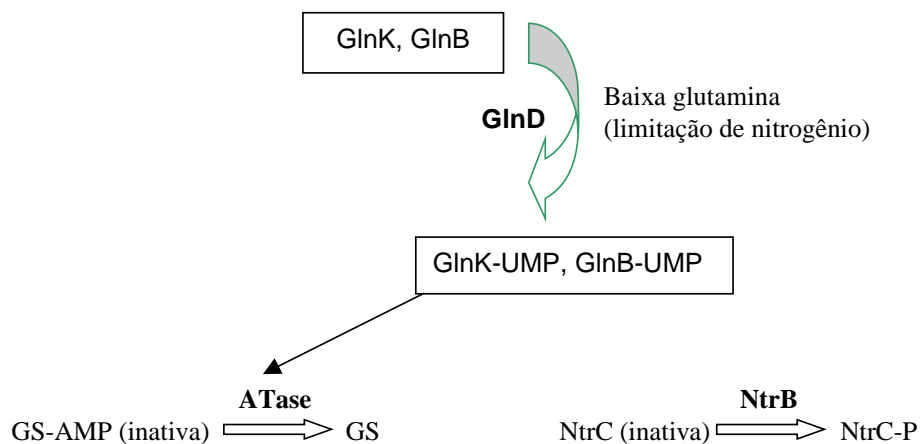
As proteínas NtrB e NtrC são membros de famílias de transdutores de sinal compostos por uma histidina quinase/fosfatase (NtrB) e a proteína regulatória correspondente (NtrC) (PORTER *et al.*, 1995). Estes sistemas de transdução de sinal utilizam a fosforilação de um domínio conservado para controlar a atividade da proteína regulatória. A proteína NtrB catalisa a autofosforilação de um resíduo de histidina e este grupamento fosforil é transferido para um resíduo de aspartato da proteína regulatória NtrC (KEENER e KUSTO, 1988; WEISS e MAGAZANIK, 1988; NINFA e BENNETT, 1991; NINFA *et al.*, 1993).

Figura 3 - Regulação das atividades de NtrC e glutamina sintetase em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular

A) Excesso de nitrogênio (alta concentração de glutamina)



B) Limitação de nitrogênio (baixa concentração de glutamina)



A) Em condições de excesso de nitrogênio a concentração de glutamina intracelular é alta, a glutamina se liga à enzima GlnD favorecendo sua atividade de enzima removedora de uridilil (UR), como consequência GlnB e GlnK são desuridililadas. GlnB e GlnK desuridililadas interagem com NtrB estimulando a desfosforilação e, conseqüentemente, inativação da proteína NtrC. GlnB e GlnK desuridililadas também interagem com ATase estimulando a inativação da GS por adenililação. B) Em condições de limitação de nitrogênio os níveis de glutamina intracelular são baixos. Nestas condições GlnD atua como uridililtransferase (UTase) promovendo a uridililação de GlnB e GlnK. As formas uridililadas de GlnB e GlnK não são capazes de interagir e promover a atividade fosfatase de NtrB. Nestas condições NtrB fosforila e, conseqüentemente, ativa a proteína NtrC. GlnB e GlnK uridililadas interagem com a enzima ATase promovendo a desadenilação e ativação da GS.

Em altos níveis de nitrogênio fixado a concentração de glutamina intracelular é aumentada, com isso a GlnD tem sua atividade removedora de uridilil estimulada, favorecendo a desuridililação da GlnB (BROWN *et al.*, 1971; ADLER, *et al.*, 1975; BLOOM *et al.*, 1978; BUENO *et al.*, 1985; FRANCIS e ENGLEMAN, 1978; KAMBEROV *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 1998a; JIANG *et al.*, 1998b; JIANG *et al.*, 1998c). GlnB desuridililada liga-se à proteína NtrB, que por sua vez desfosforila NtrC, inativando-a (JIANG e NINFA, 1999).

A proteína GlnB também regula a adenililação e desadenililação da proteína glutamina sintetase pela enzima adenililtransferase, ATase (Figura 3). Em altos níveis de nitrogênio fixado, a ATase complexa com a GlnB livre e glutamina e catalisa a adenililação da glutamina sintetase, inativando-a. Em baixas concentrações de nitrogênio fixado, a glutamina sintetase é ativada por desadenililação também catalisada pela ATase complexada à proteína GlnB-UMP (BROWN *et al.*, 1971; JIANG *et al.*, 1998c; NINFA e JIANG, 2005).

1.8 Proteína GlnK

Em 1996, VAN HEESWIJK e colaboradores descreveram a presença de um gene que codifica para outra proteína da família P_{II} em *E. coli*. O gene foi denominado *glnK*, e seu produto GlnK. Ao contrário do que acontece com o gene *glnB*, o qual apresenta expressão constitutiva, *glnK* está sob controle do sistema Ntr. O gene *glnK* em *E. coli* é co-expresso com o gene *amtB* que codifica para uma proteína transmembrana envolvida no transporte de amônio (AmtB). As proteínas GlnK e GlnB de *E. coli* apresentam 67% de identidade.

A presença de uma segunda proteína do tipo P_{II} não é restrita a *E. coli*, muitos organismos apresentam duas proteínas do tipo P_{II}, em alguns casos até 4 proteínas desta família podem ser encontradas (ARCONDENGUY *et al.*, 2001). Devido à alta semelhança na estrutura primária seria esperado que algumas das características e funções descritas para a proteína GlnB também fossem compartilhadas pela proteína GlnK. Experimentos subseqüentes em *E. coli* mostraram que GlnK pode compartilhar características e funções com GlnB porém, algumas funções parecem ser restritas.

A proteína GlnK de *E. coli* também sofre uridililação em resposta a disponibilidade de nitrogênio assim como GlnB (ATKINSON e NINFA, 1998). *In vitro*, a proteína GlnK é uridililada de forma tão eficiente como GlnB, no entanto, a

desuridililação de GlnB-UMP é mais rápida que de GlnK-UMP (ATKINSON e NINFA, 1999), GlnK também pode controlar atividade de GS regulando a atividade da ATase *in vitro*, porém de forma menos eficiente que GlnB (ATKINSON e NINFA, 1999), sugerindo que *in vivo*, quando GlnB está presente, GlnK não tem um papel importante no controle da GS.

Em *E. coli*, GlnK, assim como GlnB, pode regular os níveis de NtrC-P controlando a atividade de NtrB (Figura 3), GlnK parece ser menos eficiente que GlnB nesta atividade (ATKINSON e NINFA 1999). Em células limitadas de nitrogênio foi observado que uma fração da proteína GlnK encontra-se desuridililada, isto se deve ao fato de que uma grande quantidade de GlnK se acumula nestas condições impossibilitando a modificação total pela proteína GlnD. Foi sugerido que uma possível função de GlnK seria controlar os níveis de NtrC-P durante deprivação de nitrogênio devido à presença de uma fração de GlnK desuridililada nestas condições (ATKINSON e NINFA, 1998; ATKINSON *et al.*, 2002; BLAUWKAMP *et al.*, 2002).

A estrutura tridimensional da proteína GlnK de *E. coli* também foi resolvida (Figura 4A), como a proteína GlnB, GlnK forma um trímero com a estrutura geral bastante semelhante à proteína GlnB, a maior diferença na estrutura das duas proteínas é observada na região do loop-T (Figura 4B). A região do loop-T de GlnB é essencial para a interação com 3 conhecidos alvos da proteína P_{II}, ATase, UTase e NtrB (JIANG *et al.*, 1997). A flexibilidade no loop-T observada na análise estrutural das proteínas P_{II} pode ser necessária para facilitar a interação específica com diferentes proteínas alvo (ARCONDEGUY *et al.*, 2001).

1.9 Formação de heterotrímeros

As proteínas GlnB e GlnK podem formar heterotrímeros *in vivo* em *E. coli*. A formação de heterotrímeros foi observada quando células de *E. coli* são cultivadas em meio limitante em amônio. Experimento de adenililação da GS *in vitro* demonstraram que heterotrímeros GlnK-GlnB totalmente uridililados estimulam a atividade de desadenililação da ATase, porém de forma menos eficiente que homotrímero de GlnB (VAN HEESWIJK *et al.*, 2000). Foi sugerido por estes autores que a formação de heterotrímeros *in vivo* pode estar relacionada com o ajuste fino no controle do sistema Ntr.

B – Comparação da estrutura dos monômeros das proteínas GlnB e GlnK de *E. coli*. Sobreposição das cadeias de carbono alfa da proteína GlnB (preto) e GlnK (vermelho) com a posição do resíduo Tyr-51 indicado em cada monômero (XU *et al.*, 1998).

A relação glutamina/ α -cetoglutarato na célula aumenta em condições de suficiência de nitrogênio e diminui em condições de limitação (SENIOR, 1975; KUSTU *et al.*, 1984). Os modelos iniciais sugeriam que esta relação seria responsável pelo controle das atividades UTase/UR da proteína GlnD, e conseqüentemente, pelo controle do estado de modificação da proteína GlnB em *E. coli* (MERRICK e EDWARDS, 1995).

13

cetoglutarato (JIANG *et al.*, 1998c). A uridililação de GlnB requer ATP e α -cetoglutarato, sendo inibida por glutamina. A desuridililação requer ATP e α -cetoglutarato, porém é estimulada por glutamina (KAMBEROV *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 1998a; JIANG *et al.*, 1998c).

O modelo atual sugere que a interação da proteína GlnB de *E. coli* com seus receptores ATase e NtrB depende primariamente da concentração de glutamina na célula (JIANG e NINFA, 2005). A glutamina se liga à proteína GlnD modulando sua atividade causando a uridililação ou desuridililação de GlnB e, conseqüentemente, alterando a capacidade de GlnB interagir com seus receptores. A concentração de α -cetoglutarato na célula pode, entretanto, alterar a capacidade de GlnB ligar à alguns de seus receptores (JIANG e NINFA, 2005).

A proteína GlnB de *E. coli* sempre apresenta pelo menos uma molécula de α -cetoglutarato ligada por trímero em condições fisiológicas (KAMBEROV *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 1998c). A ligação de uma molécula de α -cetoglutarato diminui a afinidade dos dois sítios restantes fazendo com que a proteína seja saturada com α -cetoglutarato apenas em altas concentrações, quase acima da faixa fisiológica. (JIANG *et al.*, 1998c; JIANG e NINFA, 1999). A proteína GlnB pode portanto existir em diferentes conformações dependendo do número de moléculas de α -cetoglutarato ligadas (JIANG *et al.*, 1998c).

Em concentrações elevadas de α -cetoglutarato o trímero de GlnB livre (sem UMP) é capaz de ligar mais de uma molécula de α -cetoglutarato, isto reduz a afinidade de GlnB por NtrB. Nestas condições NtrB fosforila e ativa a proteína NtrC (KAMBEROV *et al.*, 1995). Quando GlnB está saturada com α -cetoglutarato, a ligação com a ATase é inibida fazendo com que a modificação da GS seja menos eficiente, contudo a GS ainda pode ser modificada por regulação alostérica da ATase ligada a glutamina (JIANG *et al.*, 1998c). Um efeito similar do α -cetoglutarato é observado na proteína GlnK. Em altas concentrações de α -cetoglutarato, GlnK livre tem menor capacidade de estimular a atividade fosfatase de NtrB e de adenililtransferase da ATase (ATKINSON e NINFA, 1999).

1.11 Transportadores de amônio

O amônio é a fonte preferencial de nitrogênio para a maioria das células procarióticas. O amônio (o termo amônio será usado para descrever as espécies

NH_3 e NH_4^+ , quando necessária à distinção de um dos compostos será indicado com símbolos NH_3 e NH_4^+) pode ser assimilado diretamente em glutamina e glutamato, os quais são doadores chave de nitrogênio para as reações biossintéticas (MERRICK e EDWARDS, 1995). Outras fontes de nitrogênio como aminoácidos têm que ser primeiramente degradados à amônio enquanto que fontes inorgânicas como nitrato, nitrito e nitrogênio atmosférico tem que ser reduzidos antes da assimilação. Entretanto, para que o amônio extracelular seja metabolizado ele precisa atravessar à membrana celular. A forma não protonada NH_3 , pode entrar na célula por difusão pela membrana fosfolipídica, este processo pode ocorrer em ambas às direções (KLEINER, 1985). Quando a concentração extracelular de amônio é alta, a difusão para dentro da célula é suficiente para suportar o metabolismo celular. Em condições limitantes de amônio extracelular, a presença de proteínas transportadoras se faz necessária para que o transporte seja eficiente (KLEINER, 1985). O primeiro trabalho sugerindo a presença de uma proteína transportadora de amônio foi realizado no fungo *Penicillium chrysogenum* (HACKETTE *et al.*, 1970), posteriormente outros estudos sugeriram a presença de tais proteínas em outros fungos e algas (KLEINER, 1985). Desde então um grande número de sistemas transportadores de amônio foram descritos. Os primeiros genes codificadores para proteínas transportadoras de amônio foram identificados em levedura e plantas.

1.12 Família Amt

A identificação dos primeiros genes codificadores para proteínas transportadoras de amônio foi facilitado pelo isolamento de uma estirpe mutante de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentava deficiência de crescimento em meio contendo baixas concentrações de amônio (MARINI *et al.*, 1994; NINNEMANN *et al.*, 1994). Bibliotecas genômicas de cDNA de *S. cerevisiae* e *Arabidopsis thaliana* foram utilizadas para complementar o mutante de *S. cerevisiae*, levando ao isolamento dos genes *MEP1* de *S. cerevisiae* e *AMT1* de *A. thaliana*. Com o crescimento exponencial dos bancos de dados de seqüências de DNA, genes codificadores para proteínas homólogas aos genes *MEP1* e *AMT1* foram identificadas em outros organismos como Bacteria, Arquea, fungos, nematodos, insetos, peixes e primatas. Esta família de proteínas foi denominada Amt (VON WIREN e MERRICK, 2004). Alguns organismos possuem mais de um gene *amt* como o caso de várias bactérias, plantas e *S. cerevisiae* (VON WIREN e MERRICK, 2004).

Dentre os organismos que têm seu genoma completamente seqüenciado, os genes codificadores para proteínas da família Amt não foram encontrados apenas em algumas bactérias patogênicas. Isto se deve ao fato de que tais bactérias provêm suas fontes de nitrogênio dos seus hospedeiros e conseqüentemente, não necessitam de sistemas de transporte de amônio (THOMAS *et al.*, 2000a).

Comparações de seqüência de aminoácidos revelou que proteínas humanas Rh apresentam alta similaridade com proteínas da família Amt. As proteínas humanas RhAG e RhGK podem restaurar o fenótipo da estirpe de *S. cerevisiae* deficiente em crescimento em meio contendo baixas concentrações de amônio (MARINI *et al.*, 2000). Posteriormente foi demonstrado que as proteínas Rh podem transportar o análogo estrutural do amônio, metilamônio, em eritrócitos (RIPOCHE *et al.*, 2004). A função das proteínas Rh ainda não está esclarecida e entre as funções propostas estão a detoxificação da amônia e o transporte de CO₂. Recentemente foi demonstrado que a disrupção do gene *Rhbg* em camundongos não causa nenhum fenótipo evidente, sugerindo que a proteína RhBG não é um elemento essencial para a excreção de amônio nestes animais (CHAMBREY *et al.*, 2005).

1.13 O gene *amtB* em *A. brasilense*

Usando oligonucleotídeos degenerados com seqüências baseadas em regiões conservadas da proteína AmtB de diversos organismos, VAN DOMMELEN e colaboradores (1998) e HUERGO e colaboradores (1998), de forma independente, isolaram, por PCR, o gene que codifica a proteína AmtB de *A. brasilense*.

Em contraste com o que acontece em *E. coli*, o gene *amtB* de *A. brasilense* é expresso de forma monocistrônica, e tem sua expressão aumentada em condições de limitação de nitrogênio, de forma dependente do fator σ^N da RNA polimerase e da proteína NtrC (VAN DOMMELEN *et al.*, 1998). Um mutante *amtB* de *A. brasilense* é incapaz de captar metilamônio, porém a captação de amônio não é alterada em comparação com a estirpe selvagem, sugerindo a presença de um segundo mecanismo de transporte. Uma deficiência de crescimento em relação à estirpe selvagem foi observada em concentração de amônio de 0,1mM (VAN DOMMELEN *et al.*, 1998).

1.14 Substrato e estrutura das proteínas Amt

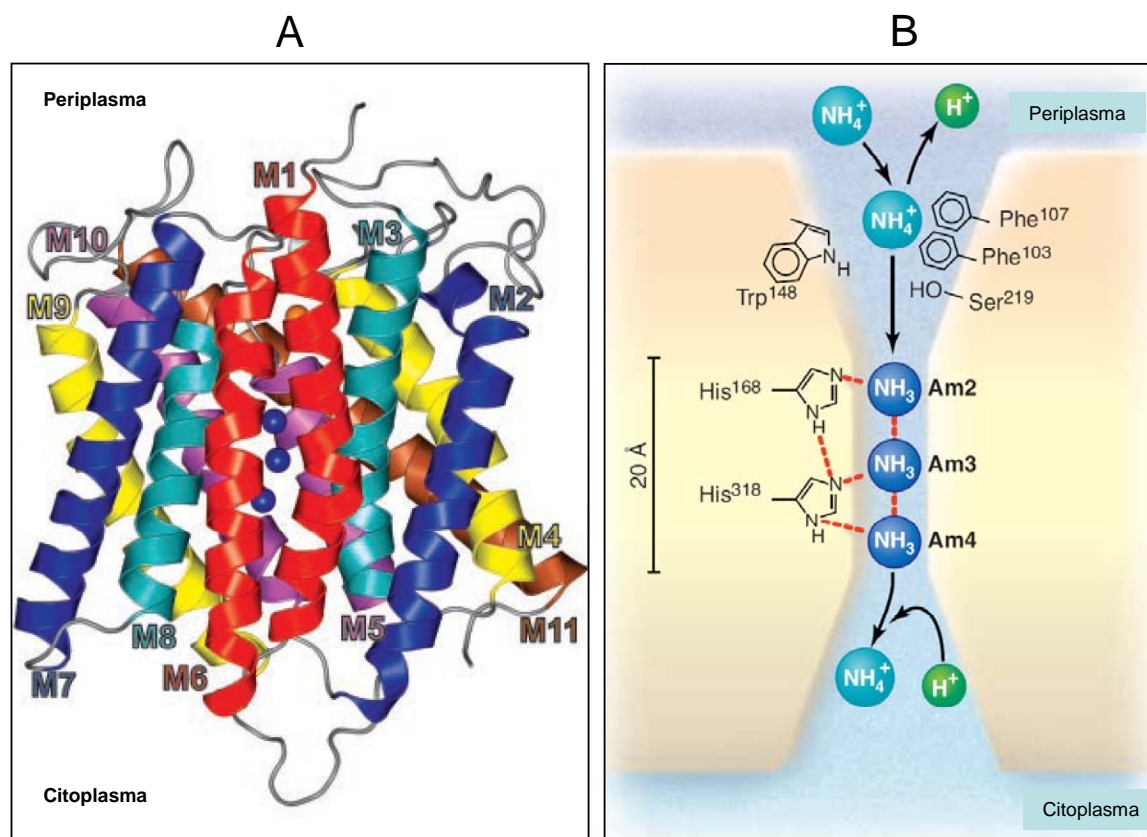
O amônio existe como uma mistura de duas espécies (NH₃ e NH₄⁺), sendo

que a concentração de cada uma depende do pH do meio. Como o pKa é de 9,26, a maior parte do amônio encontra-se na forma NH_4^+ em pH neutro. Devido à dificuldade experimental de se determinar a captação de amônio por microrganismos, a grande maioria dos estudos com proteínas da família Amt foi realizada com o análogo estrutural metilamônio que pode ser obtido na forma comercial $^{14}\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ e serve de substrato para a maioria dos membros da família Amt. Metilamônio não é o substrato natural sendo seu transporte fortemente inibido competitivamente por amônio, além disso, metilamônio é rapidamente convertido a metilglutamina por ação da GS (SOUPENE *et al.*, 1998; JAVELLE *et al.*, 2005). Na grande maioria dos trabalhos a forma de como os experimentos foram conduzidos (dosando radioatividade intracelular) impossibilita a separação da atividade de transporte de amônio da atividade de GS (JAVELLE *et al.*, 2005). Estes fatores dificultam a interpretação dos resultados como cinética de transporte e possível mecanismo de ação.

Vários são os mecanismos propostos para o transporte empregado pelos membros da família Amt. A grande maioria dos trabalhos sugere um mecanismo onde a forma transportada seria NH_4^+ de forma dependente de energia (VON WIREN e MERRICK, 2004). O outro possível mecanismo sugere que as proteínas Amt formariam um canal bidirecional para NH_3 (SOUPENE *et al.*, 1998; JAVELLE *et al.*, 2005).

A determinação de estrutura tridimensional da proteína AmtB de *E. coli* ligada ou não à amônio e a metilamônio, indica que a proteína não sofre mudanças conformacionais na presença dos seus substratos, sugerindo que a proteína AmtB forma um canal para a condução de NH_3 (KHADEMI *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2004). O mecanismo proposto sugere que NH_4^+ (ou NH_3) se ligaria inicialmente a um vestíbulo periplasmático da proteína, sendo então desprotonado devido à entrada em um canal para NH_3 que reduz o pKa para < 6 . Após a passagem de NH_3 por este canal hidrofóbico, NH_3 atinge o meio intracelular sendo novamente protonado (KHADEMI *et al.*, 2004). (Figura 5).

Figura 5 – Estrutura da proteína AmtB de *E. coli*



A – Vista lateral do modelo estrutural proposto para o monômero da proteína AmtB de *E. coli*. As 11 hélices transmembrana estão enumeradas (M1 – M11), os sítios para ligação de NH_4^+ e NH_3 estão representados no interior da proteína com esferas laranja e azuis respectivamente.

B – Modelo proposto para o transporte de NH_3 pela proteína AmtB. Os aminoácidos na região periplasmática do poro (Trp148, Phe107, Phe103 e Ser219) estabilizam NH_4^+ no sítio Am1. A porção central da proteína apresenta um canal não-polar de 20 Å, nesta porção os resíduos de Histidina 168 e 318 estabilizam 3 moléculas de NH_3 nos sítios Am2, Am3 e Am4, através de pontes de hidrogênio. As moléculas de NH_3 retornam ao equilíbrio com NH_4^+ na região do vestíbulo citoplasmático (KHADEMI *et al.*, 2004).

1.15 Complexo GlnK-AmtB

Os genes *amt* da maioria das Bactérias e Archaeas encontram-se associados com um gene que codifica para uma proteína da família P_{II}. Devido à alta conservação deste operon entre os procariotos, foi sugerido que os produtos destes genes poderiam interagir fisicamente (THOMAS *et al.*, 2000a).

As proteínas GlnK e GlnB de *E. coli* e GlnK de *Azotobacter vinelandii* associam-se à membrana interna de forma dependente de amônio e da proteína

AmtB (COUTTS *et al.*, 2002). As proteínas GlnK e AmtB de *E. coli* podem ser co-purificadas indicando que a associação da proteína GlnK à membrana ocorre devido à interação direta com a proteína AmtB (JAVELLE *et al.*, 2004; A. DURAND, comunicação pessoal). A ligação da proteína GlnK à membrana citoplasmática é regulada pelo estado de uridililação de GlnK, sendo maximizada quando GlnK está desuridililada, ou seja, quando as células são submetidas a condições de excesso de nitrogênio (COUTTS *et al.*, 2002). A interação GlnK-AmtB é rápida (pode ser detectada 30 segundos após a exposição a amônio), reversível e bastante sensível aos níveis de amônio extracelular sendo detectada após a adição de 50 μ M de amônio no meio (JAVELLE *et al.*, 2004). A ligação de GlnK à membrana requer a porção C-terminal de AmtB, sugerindo que a região C-terminal de AmtB constitui o sítio de interação para proteínas da família P_{II} (COUTTS *et al.*, 2002).

A interação de proteínas da família P_{II} com a membrana de forma dependente da proteína AmtB foi relatada em *Bacillus subtilis* (Firmibactéria) (DETSCH e STULKE, 2003), *Corynebacterium glutamicum* (Actinomiceto) (STROSSER *et al.*, 2004) além das duas espécies de γ -proteobactéria anteriormente relatadas (COUTTS *et al.*, 2002), sugerindo que a interação entre proteínas P_{II} e AmtB seja um processo universal entre os procariotos. Mas qual é a função da interação GlnK-AmtB? Várias possíveis funções têm sido sugeridas:

1- A ligação de GlnK a AmtB parece reduzir a atividade da proteína AmtB. Estas conclusões foram baseadas em experimentos de transporte de metilamônio em células expressando diferentes níveis da proteína GlnK (COUTTS *et al.*, 2002) e em células expressando uma forma de GlnK não passível de uridililação (GlnKY51F) (COUTTS *et al.*, 2002; JAVELLE *et al.*, 2004).

2- O rápido seqüestro de GlnK por AmtB após um aumento nos níveis de amônio extracelular reduz os níveis de GlnK livre no citoplasma (JAVELLE *et al.*, 2004). Uma consequência desta resposta seria evitar a redução dos níveis de NtrC-P devido a uma flutuação momentânea nos níveis de nitrogênio (JAVELLE *et al.*, 2004). Em muitos organismos, proteínas da família P_{II} têm um papel no controle transcricional e pós-traducional da nitrogenase, o seqüestro das proteínas P_{II} por AmtB em resposta a pequenas flutuações nos níveis de amônio poderia constituir em um componente regulatório do processo de fixação de nitrogênio (JAVELLE *et al.*, 2004).

A conservação do operon *glnKamtB* sugere que a proteína GlnK tenha

evoluído conjuntamente com a proteína AmtB e que a função primária da proteína GlnK seja de regular a atividade de AmtB (VON WIREN e MERRICK, 2004). Baseado neste modelo as proteínas parálogas de GlnK que são encontradas em Bacteria (GlnB) e Archea (Nifl), provavelmente surgiram de um evento de duplicação gênica seguido de especialização (VON WIREN e MERRICK, 2004). Ambas as proteínas GlnK e AmtB são triméricas. A razão para a estrutura trimérica das proteínas P_{II} não era evidente até então uma vez que nenhum de seus alvos (exceto AmtB) exibe tal tipo de estrutura quaternária. Entretanto, se a função primária de GlnK for de controlar AmtB, a sua estrutura trimérica pode ter se perpetuado devido à necessidade de simetria para a interação ótima entre as duas proteínas (VON WIREN e MERRICK, 2004). De fato, modelos estruturais com as proteínas Amt-1 e GlnB-1 de *Archaeoglobus fulgidus* indicam que as estruturas triméricas de ambas as proteínas podem ser quase que perfeitamente agrupadas (ANDRADE *et al.*, 2005).

1.16 Proteínas tipo P_{II} em *A. brasilense*

1.16.1 A proteína GlnB

O sequenciamento da região a montante do gene *glnA* (que codifica para enzima GS) indicou a presença de uma ORF cujo produto apresenta similaridade com a proteína GlnB de *E. coli* (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990). A expressão do gene *glnB* é aumentada quando as células são submetidas à limitação de nitrogênio, no entanto a proteína responsável pelo controle da expressão de *glnB* ainda não é conhecida (descrição detalhada no item 1.24).

Mutantes *glnB* de *A. brasilense* crescem normalmente em meio contendo amônio ou glutamina como fonte de nitrogênio, entretanto apresentam um fenótipo Nif⁻ (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993; DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996). Neste organismo a proteína GlnB-UMP é necessária para a atividade da proteína NifA, a ativadora de transcrição dos genes *nif* (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993; ARSENE *et al.* 1996; VAN DOMMELEN *et al.*, 2002) (item 1.22.2). Outro fenótipo descrito para o mutante *glnB* é uma redução na motilidade celular quando cultivado em meio semi-sólido de forma independente da fonte de nitrogênio utilizada. Como o mutante apresenta o mesmo perfil de flagelos observado na estirpe selvagem, foi sugerido que a proteína GlnB tenha uma função no metabolismo energético celular (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996).

Em contraste com o sistema descrito em *E. coli*, a proteína GlnB de *A.*

brasiliense parece não desempenhar um papel importante no controle da modificação pós-traducional da enzima GS uma vez que não é observada auxotrofia para glutamina na ausência de GlnB. Porém, a proteína GlnB parece ser necessária para a desadenililação completa da GS em condições de limitação de nitrogênio (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996; DE ZAMAROCZY, 1998).

1.16.2 A proteína GlnZ

Utilizando oligonucleotídeos degenerados com a sequência baseada em regiões conservadas das proteínas P_{II} de diversos organismos, DE ZAMAROCZY e colaboradores (1996) identificaram, por PCR, um gene que codifica para uma segunda proteína da família P_{II} em *A. brasiliense*. Este gene foi denominado *glnZ* e seu produto proteína GlnZ. A expressão do gene *glnZ* foi estudada utilizando ensaios de mRNA e fusões traducionais *glnZ-lacZ* em diferentes estirpes. A expressão de *glnZ* é monocistrônica e controlada pela proteína NtrC, sendo aumentada em condições de limitação de nitrogênio (DE ZAMAROCZY, 1998). Estes estudos evidenciaram o papel das proteínas GlnB e GlnZ no controle do sistema Ntr. No mutante *glnB* a expressão de *glnZ* não é regulada por nitrogênio, indicando que GlnB é necessária para controle da proteína NtrB e NtrC. No mutante *glnZ* a expressão de *glnZ* não é alterada em comparação com a estirpe selvagem, sugerindo que GlnZ não participa no controle da atividade das proteínas NtrB e NtrC (DE ZAMAROCZY, 1998).

O mutante *glnZ* de *A. brasiliense* é capaz de fixar nitrogênio como observado na estirpe selvagem (DE ZAMAROCZY, 1998). A modificação pós-traducional da GS observada no mutante *glnZ* e duplo mutante *glnBglnZ* é semelhante à observada na estirpe selvagem, sugerindo que nenhuma das proteínas P_{II} têm um papel importante no controle da atividade da enzima ATase (DE ZAMAROCZY, 1998). O duplo mutante apresenta ainda deficiência de crescimento em meio rico ou mínimo, este fenótipo é complementado com o gene *glnB* ou com o gene *glnZ*, indicando que a presença de uma das proteínas P_{II} é necessária para o crescimento celular (DE ZAMAROCZY, 1998).

A proteína GlnZ pode estar relacionada com o transportador de íons amônio em *A. brasiliense*, já que mutantes *glnZ* exibem taxa de transporte de amônio maior que a estirpe selvagem e, quando *glnZ* é superexpressa a taxa de transporte de amônio diminui (DE ZAMAROCZY, 1998). O mutante *glnZ* não apresenta reativação

da nitrogenase após a adição de amônio ao meio de cultura, sugerindo que a proteína GlnZ está envolvida no controle pós-traducional de regulação da nitrogenase provavelmente controlando a atividade da enzima DraG (item 1.24) (KLASSEN *et al.*, 2001).

1.17 Modificação pós-traducional de GlnB e GlnZ

As proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* são marcadas com uracil tritiado quando as células são submetidas a condições limitantes de nitrogênio fixado, nenhum sinal é observado em células cultivadas na presença de amônio (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996; DE ZAMAROCZY, 1998). Isto levou conclusão de que as proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* são uridililadas em condições de limitação de nitrogênio de forma semelhante ao descrito para as proteínas P_{II} de *E. coli*.

Ensaio *in vitro* com as proteínas GlnB e GlnZ indicam que as proteínas P_{II} de *A. brasilense* são uridililadas pela proteína GlnD de *E. coli* na presença de ATP e α -cetoglutarato, sendo a uridililação inibida por glutamina. A reação de desuridililação é estimulada por glutamina (ARAUJO *et al.*, 2004; L. M. ARAÚJO, comunicação pessoal).

1.18 O gene *glnD* em *A. brasilense*

A busca por um fenótipo negativo para transporte de metilamônio e crescimento em nitrato, em um banco de mutantes cromossomais obtidos com a inserção do transposon Tn5-B30, levou ao isolamento do gene *glnD* que codifica para a proteína UTase/UR (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002). O fenótipo do mutante *glnD* está relacionado com o papel de GlnD no controle do sistema ntr através da modificação das proteínas P_{II} (GlnB e GlnZ). A expressão dos genes *amtB* (que codifica para o transportador de amônio/metilamônio) e *nasB* (que codifica para a enzima assimilatória nitrato redutase) estão sob o controle do sistema Ntr. Na ausência de GlnD, GlnB não é uridililada em limitação de nitrogênio, levando à desfosforilação constitutiva da proteína NtrC e, conseqüentemente, desabilitando a expressão dos genes *amtB* e *nasB*. Contrariamente do que ocorre em enterobactérias, o mutante *glnD* de *A. brasilense* não é auxotrófico para glutamina, sugerindo que GlnD não é necessária para o controle da atividade da enzima GS. Entretanto, em condições limitantes de nitrogênio, GlnD é necessária para a desadenililação completa da GS (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002). O gene *glnD* é

necessário para a atividade da nitrogenase (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002). Pouco se sabe a respeito da regulação da expressão do gene *glnD*. Sua expressão é aumentada em células sujeitas a limitação de nitrogênio, porém esta regulação é apenas parcialmente dependente do sistema Ntr. Nenhuma região promotora ou sequência regulatória foi sugerida para este gene (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002).

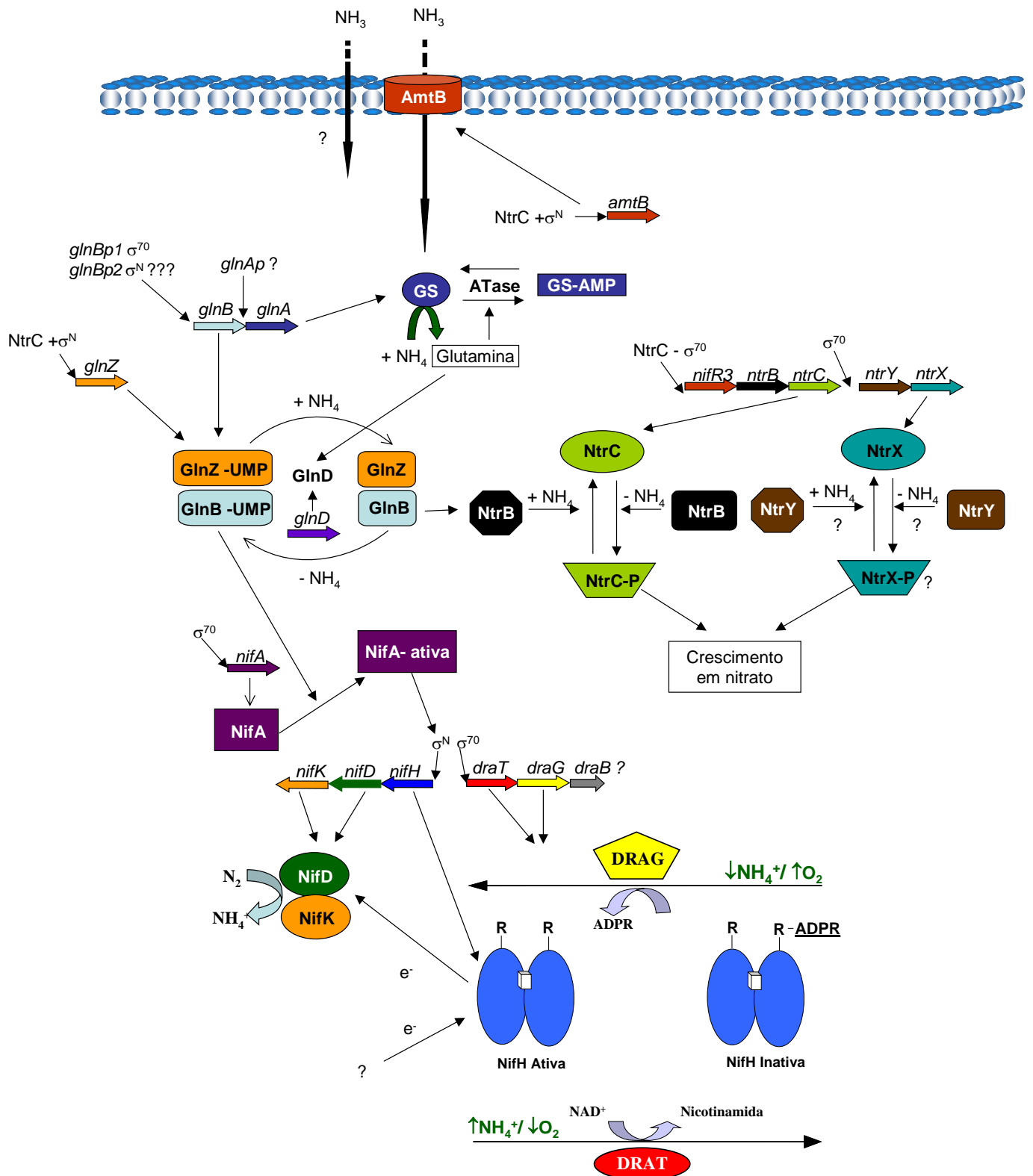
1.19 Sistema NtrY-NtrX

O sequenciamento da região a jusante dos genes *ntrBC* em *Azorhizobium caulinodans* revelou a presença de dois genes cujos produtos são bastante similares às proteínas NtrB e NtrC. Estes genes foram denominados *ntrYX* e seus produtos NtrY e NtrX, os genes *ntrYX* são co-transcritos por um promotor parcialmente dependente de NtrC (PAWLOWSKI *et al.*, 1991). A proteína NtrY apresenta um domínio transmembrana e similaridade com NtrB, a proteína NtrX apresenta similaridade com NtrC. Mutações nos genes *ntrY* e *ntrX* afetaram a fixação de nitrogênio tanto em vida livre quanto em simbiose. Mutantes *ntrYX* apresentam alteração na expressão do gene *nifA* (PAWLOWSKI *et al.*, 1991).

A jusante dos genes *ntrBC* de *A. brasilense* também foi identificado o par *ntrYX* (MACHADO *et al.*, 1995; ISHIDA *et al.*, 2002). Estes genes parecem estar envolvidos no crescimento em nitrato, porém sua função não foi precisamente esclarecida devido a aparente inviabilidade de mutantes insercionais (VITORINO *et al.*, 2001; ISHIDA *et al.*, 2002).

O sistema *ntr* em *A. brasilense* parece ser mais complexo do que em bactérias entéricas devido à presença de dois sistemas de dois componentes (NtrBC e NtrYX). Um esquema geral da cascata de interações conhecidas e supostas dentro do sistema *ntr* de *A. brasilense* está apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Sistema Ntr em *A. brasilense*



Os pontos de interrogação indicam interações ou formas não comprovadas experimentalmente e sugeridas por analogia com sistemas homólogos.

1.20 Organização estrutural de promotores em procariotos

Promotores são seqüências de DNA reconhecidas pela RNA polimerase que especificam o local de início de transcrição. A RNA polimerase capaz de iniciar a transcrição é denominada RNA polimerase holoenzima e contém 5 subunidades com a seguinte estequiometria, $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ (deHASETH *et al.*, 1998). A subunidade σ fica fracamente ligada ao resto da enzima ($\alpha_2\beta\beta'$), o qual é denominado de núcleo da RNA polimerase. A subunidade σ é responsável pela especificidade no processo de reconhecimento do promotor sendo desligada do núcleo da RNA polimerase durante o início de transcrição (deHASETH *et al.*, 1998; WOSTEN, 1998; BUCK *et al.*, 2000). A identificação, caracterização e análise da seqüência de vários fatores σ levaram a classificação destes em duas famílias (LONETTO *et al.*, 1992; WOSTEN, 1998; BUCK *et al.*, 2000).

A maioria dos fatores σ , tanto em bactérias Gram-negativas quanto em Gram-positivas, pertence a uma família de proteínas que apresentam similaridade com o fator σ^{70} (produto do gene *rpoD*), que é o fator σ de *E. coli* envolvido na transcrição da maior parte dos genes deste organismo (LONETTO *et al.*, 1992; WOSTEN, 1998). Um outro grupo compreende os fatores relacionados ao fator σ^N , que são requeridos para expressão de genes envolvidos em processos como a fixação de nitrogênio, transporte de ácidos dicarboxílicos, biossíntese de flagelo dentre outros (MERRICK, 1993; WOSTEN, 1998; BARRIOS *et al.*, 1999; BUCK *et al.*, 2000; REITZER e SCHNEIDER, 2001). Os fatores σ^N apresentam uma baixa similaridade com os fatores σ^{70} exceto em um curto segmento que está envolvido na ligação com a RNA polimerase (TINTUT e GRALLA, 1995).

Nos genes bacterianos transcritos pela σ^{70} RNA polimerase holoenzima, a ligação ao promotor e a separação das fitas são eventos acoplados e a formação do complexo aberto ocorre sem a necessidade de ativação (GRALLA, 1993). Nos genes transcritos pela σ^N RNA polimerase holoenzima, o reconhecimento do promotor e a formação do complexo aberto são eventos distintos (GRALLA, 1993; WOSTEN, 1998). Para que o complexo fechado possa promover a fusão da dupla fita do DNA e iniciar a transcrição é necessária a presença de uma proteína ativadora e hidrólise de ATP (GRALLA, 1993; WOSTEN, 1998; BUCK *et al.*, 2000).

1.20.1 Promotores do tipo σ^N

Os promotores reconhecidos pela σ^N RNA polimerase holoenzima apresentam resíduos conservados nas regiões -24 e -12 em relação ao local de início de transcrição. A sequência consenso para estes promotores é $Y_{72}T_{83}G_{99}G_{100}C_{74}A_{72}C_{65}G_{55} - N_4 - T_{73}T_{79}G_{99}C_{92}W_{87}$, onde Y indica pirimidinas e W indica A ou T e os subscritos, a frequência de ocorrência da base neste grupo de promotores (BARRIOS *et al.*, 1999). Alterações nos nucleotídeos localizados nas posições -13/-12 e -25/-24 assim como alterações no espaçamento entre estas duas regiões alteram a atividade do promotor (BARRIOS *et al.*, 1999; BUCK, 1986; MERRICK, 1993). A σ^N RNA polimerase holoenzima liga-se à região promotora formando um complexo fechado que é incapaz de se isomerizar em complexo aberto na ausência de uma proteína ativadora. A proteína ativadora atua como um efector positivo da transcrição de promotores σ^N e sua atividade é controlada por sinais fisiológicos que determinam sua ligação a seqüências conservadas UAS (do inglês “*upstream activator sequence*”), as quais normalmente encontram-se 100pb a montante do promotor (MERRICK, 1993). A interação da RNA polimerase com a proteína ativadora requer a formação de dobras no DNA que separa as duas proteínas; esta curvatura é, em alguns casos, mediada pela proteína IHF (MERRICK, 1993) ou por seqüências de A e T presentes no DNA (CHEEMA *et al.*, 1999; WOSTEN, 1998). O gene *rpoN* (que codifica para o fator σ^N) de *A. brasilense* foi seqüenciado e caracterizado, seu produto está envolvido na fixação de nitrogênio, crescimento em nitrato, transporte de amônio e biossíntese de flagelo (MILCAMPES *et al.*, 1996).

1.20.2 Promotores do tipo σ^{70}

Os promotores reconhecidos pela σ^{70} RNA polimerase holoenzima apresentam regiões conservadas localizadas próximas às regiões -10 e -35 do início de transcrição. O consenso para a região -35 foi definido como $T_{69}T_{79}G_{61}A_{56}C_{54}A_{54}$ e para a região -10, $T_{77}A_{76}T_{60}A_{61}A_{56}T_{82}$ (LISSER e MARGALIT, 1993). Os subscritos indicam a frequência das bases mais conservadas. As regiões -10 e -35 são espaçadas por 16 a 18pb e, na maioria dos promotores, a alteração do espaçamento entre as regiões conservadas altera a atividade promotora (deHASETH *et al.*, 1998; WOSTEN, 1998).

1.21 Regulação transcricional por NtrC

A proteína NtrC é capaz de se ligar a seqüências específicas do DNA caracterizadas pelo consenso TGCAC-N5-TGGTGCA (REITZER e MAGASANIK, 1985). Seqüências com alta homologia ao consenso caracterizam sítios de alta afinidade para a proteína NtrC, enquanto que as substituições nesta seqüência produzem sítios de baixa afinidade. Os sítios de alta afinidade necessitam de menor concentração de proteína para a ativação do promotor (SCHNEIDER *et al.*, 1991).

Em condições limitantes de nitrogênio, a proteína NtrC é fosforilada por NtrB e atua como ativadora da transcrição de promotores do tipo σ^N . A proteína NtrC pode também atuar como repressor transcricional, como foi inicialmente descrito para o promotor do tipo σ^{70} , *glnAp1* de *E. coli*, uma vez que o sítio de início de transcrição deste gene está sobreposto a seqüência NtrC-UAS (REITZER e MAGASANIK, 1985).

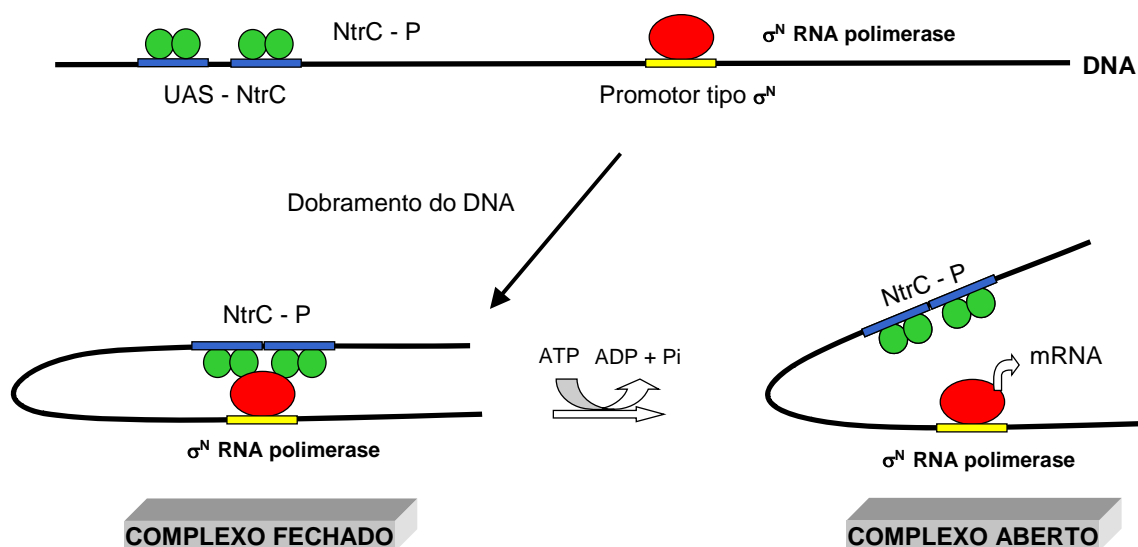
Para que NtrC seja capaz de ativar a transcrição é necessária a formação de um tetrâmero ou um oligômero de maior ordem, sendo que a fosforilação induz a oligomerização (PORTER *et al.*, 1995; ARCONDEGUY *et al.*, 2001). A proteína NtrC não fosforilada é encontrada sob forma de dímero e, apesar de inativa também pode se ligar a seqüências UAS no DNA (RIPPE *et al.*, 1998).

A função da proteína NtrC-P na ativação da transcrição é catalisar a isomerização do complexo fechado formado pela RNA polimerase - σ^N ligada à região promotora, em um complexo aberto funcional (PORTER *et al.*, 1995). A ativação depende do contato entre a RNA polimerase - σ^N e o oligômero da proteína NtrC-P ligada a seu sítio, com formação de uma alça no DNA (SU *et al.*, 1990). A função do sítio para NtrC é facilitar a oligomerização da proteína e aproximar NtrC do promotor, aumentando sua concentração próxima da RNA polimerase e a freqüência de contato entre estas duas proteínas. A presença de dois ou mais sítios vizinhos de ligação para NtrC facilita o processo de oligomerização (PORTER *et al.*, 1995). A reação de isomerização do complexo fechado para o complexo aberto durante o início de transcrição requer a hidrólise de ATP (WEISS *et al.*, 1991). Um modelo de ativação da transcrição por NtrC está mostrado na Figura 7.

A proteína NtrC é composta de três domínios funcionais; O domínio N-terminal contém a sítio de fosforilação (aspartato-54); o domínio central que é

responsável pela ativação transcricional; e o domínio C-terminal responsável pela ligação ao DNA. O domínio central está envolvido no processo de oligomerização, ligação e hidrólise de ATP, e também no contato com a subunidade σ^N da RNA polimerase. O domínio central da proteína NtrC apresenta alta similaridade com outras proteínas que compõem a família de ativadores transcricionais σ^N (WEISS *et al.*, 1991; AUSTIN *et al.*, 1991; PORTER *et al.*, 1995; FLASHNER *et al.*, 1995; NORTH *et al.*, 1996; WIDDICK *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1999; ROMBEL *et al.*, 1999; YAN e KUSTU, 1999).

Figura 7 - Modelo para ativação transcricional NtrC - dependente



A proteína NtrC fosforilada se liga a sítios UAS no DNA a montante da região promotora tipo σ^N , o oligômero de NtrC-P contata a σ^N – RNA polimerase holoenzima através de uma dobra no DNA. A proteína NtrC-P promove a hidrólise de ATP permitindo a abertura da dupla fita de DNA pela σ^N – RNA polimerase holoenzima que inicia a síntese de RNA mensageiro.

1.22 Regulação transcricional da nitrogenase

1.22.1 A Proteína NifA

Nas proteobactérias os genes estruturais da enzima nitrogenase (*nifHDK*) estão sujeitos a ativação transcricional pela proteína NifA. A proteína NifA, assim como a proteína NtrC, é uma proteína ativadora da transcrição de genes expressos a partir de promotores dependentes do fator σ^N da RNA-polimerase. A proteína NifA se liga a regiões conservadas UAS com o consenso TGT – N10 – ACA (BUCK *et*

al., 1986) cerca de 100pb a montante da região promotora σ^N e contacta a σ^N RNA polimerase através de uma dobra na molécula de DNA. A formação do complexo aberto e subsequente início de transcrição requer a hidrólise de ATP catalisada por NifA (AUSTIN *et al.*, 1990).

A proteína NifA, assim como NtrC, é composta de três domínios funcionais: um domínio N-terminal que é o domínio regulatório; um domínio central com cerca de 240 resíduos que é característico das proteínas ativadoras de transcrição associadas ao fator σ^N da RNA polimerase (NEUWALD *et al.*, 1999); e o domínio C-terminal, com cerca de 50 resíduos, contendo o motivo de ligação ao DNA. Apesar da NifA apresentar similaridade com a proteína NtrC ela não é uma proteína clássica da família de reguladores de resposta de sistemas de dois componentes. O domínio N-terminal não possui o resíduo de aspartato conservado que é o sítio de fosforilação em proteínas reguladoras de resposta como NtrC, não existe nenhuma evidência de que NifA seja fosforilada em qualquer condição. Apesar das diferenças com a família de proteínas de sistemas de dois componentes, o domínio N-terminal da proteína NifA constitui um módulo regulatório e tem um importante papel no controle da ativação transcricional (MERRICK, 2004).

1.22.2 Regulação da atividade da proteína NifA

Em todos os diazotrofos estudados, a fixação de nitrogênio é regulada principalmente a nível transcricional. Na maioria dos organismos estudados a expressão do gene *nifA* está sob controle do sistema Ntr. Em *K. pneumoniae*, a proteína NtrC fosforilada atua como um ativador transcricional do gene *nifA*. A proteína NifA, por sua vez, é o ativador da transcrição dos operons *nif* incluindo os genes estruturais da nitrogenase *nifHDK* (MERRICK, 1992). Em *A. brasilense*, a regulação transcricional é diferente daquela observada em *K. pneumoniae*. Mutantes *ntrB* e *ntrC* insercionais de *A. brasilense* apresentam um fenótipo Nif⁺ indicando a presença de outra via regulatória neste organismo (LIANG *et al.*, 1993; MACHADO *et al.*, 1995), e ao contrário de *K. pneumoniae*, o gene *nifA* de *A. brasilense* é expresso na presença de oxigênio e nitrogênio fixado e independe de NtrC (FADEL-PICHETH, *et al.*, 1999).

Em *K. pneumoniae* e outros organismos da subdivisão gamma das proteobactérias, a proteína NifA não é diretamente sensível ao oxigênio, sua atividade é controlada pela proteína NifL, a qual se liga a NifA inibindo-a na

presença de altas concentrações de amônio e oxigênio. O controle da atividade inibitória de NifL sobre a proteína NifA em resposta aos níveis de amônio é mediado pela proteína da família P_{II}, GlnK (JACK *et al.*, 1999).

Em *A. brasilense* a proteína NifL não foi detectada e a regulação pós-traducional da atividade de NifA requer a proteína GlnB. Mutantes *glnB* apresentam um fenótipo Nif⁻ (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993). A expressão do gene *nifA* não é afetada no mutante *glnB* (LIANG *et al.*, 1992), porém a expressão do gene *nifH* não ocorre neste mutante, indicando que a NifA de *A. brasilense* é traduzida numa forma inativa e que GlnB é necessária para sua ativação (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993). A proteína NifA de *A. brasilense* é capaz de ativar a expressão de uma fusão *nifH-lacZ* em *E. coli* apenas quando a proteína GlnB de *A. brasilense* está presente (ARAÚJO *et al.*, 2004). Várias deleções da região N-terminal de NifA foram construídas e a atividade da nitrogenase foi restaurada quando as formas N-truncadas de NifA são inseridas em um mutante *nifA*, indicando que a porção N-terminal não é essencial para sua atividade (ARSENE *et al.*, 1996). As formas N-truncadas de NifA também são capazes de restaurar o fenótipo Nif no mutante *glnB*. Estes dados levaram a formulação da hipótese de que em *A. brasilense* a região N-terminal de NifA inibe a atividade da proteína em condições de excesso de nitrogênio e que em condições de fixação de nitrogênio GlnB-UMP se ligaria à NifA removendo o efeito inibitório do domínio N-terminal. Dados posteriores corroboraram esta hipótese, mutantes *glnD* de *A. brasilense* ou células expressando uma forma mutante de GlnB não passível de uridililação (GlnB Y51F) apresentam um fenótipo Nif⁻ sugerindo que a uridililação de GlnB seja necessária para ativar a proteína NifA (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002; ARSENE *et al.*, 1999). Recentemente foi demonstrado que a proteína GlnB se liga diretamente à região N-terminal de NifA de *A. brasilense* (CHEN *et al.*, 2005).

1.23 Regulação pós-traducional da nitrogenase

A atividade da nitrogenase é inibida de forma reversível devido à adição de íons amônio ao meio de cultivo em vários microrganismos diazotróficos. A atividade da nitrogenase é restaurada assim que o amônio adicionado é consumido pelo metabolismo bacteriano. Este fenômeno é conhecido como “switch-off/switch-on” desligamento e religamento da nitrogenase (ZUMFT e CASTILLO, 1978). Em *A. brasilense*, *A. lipoferum* (HARTMANN *et al.*, 1986; FU *et al.*, 1989), *Rhodospirillum rubrum* (LOWERY *et al.*, 1986), *Rhodobacter capsulatus* (JOUANNEAU *et al.*, 1983)

e *Azoarcus* sp. (MARTIN e REINHOLD-HUREK, 2002), o desligamento da nitrogenase em resposta à adição de íons amônio ocorre devido à inativação da proteína NifH causada pela transferência de um grupo ADP-ribose do NAD⁺ ao resíduo de arginina-101 da proteína NifH, este processo é catalisado pela enzima DraT (KANEMOTO e LUDDEN, 1984; POPE *et al.*, 1985). A atividade de NifH é restaurada pela retirada do grupo ADP-ribose catalisada pela enzima DraG (Figura 8). O resíduo de arginina-101 participa no contato entre as proteínas NifH e NifDK durante os ciclos de transferência de elétrons necessários para a redução do nitrogênio (Figura 1). A ADP-ribosilação deste resíduo deve impedir o contato entre estas proteínas bloqueando a atividade da nitrogenase (SCHINDELIN *et al.*, 1997).

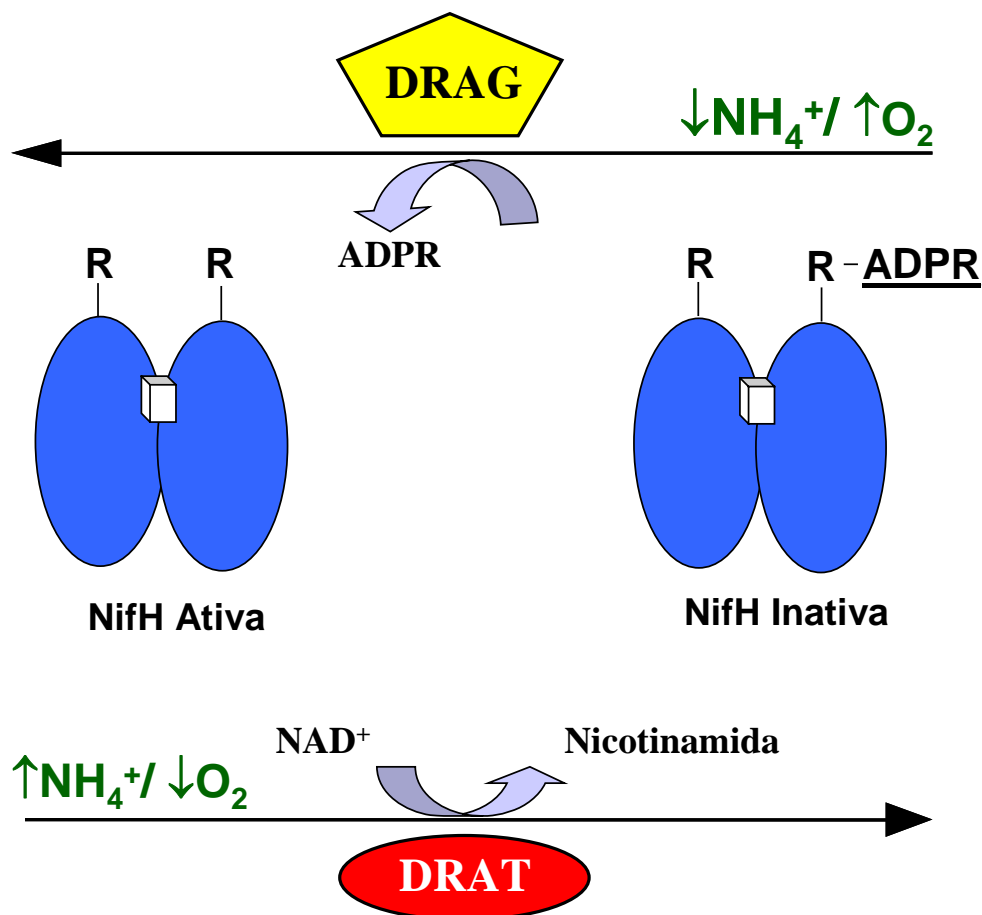
O sistema DraT e DraG além de responder a presença de íons amônio também responde a mudanças no estado energético celular (ZHANG *et al.*, 1993). Em *A. brasilense* e *Azoarcus* sp. a proteína NifH sofre ADP-ribosilação em resposta a anaerobiose e em *R. capsulatus* e *R. rubrum* em resposta à queda da luminosidade (HARTMANN *et al.*, 1986; LOWERY *et al.*, 1986; MARTIN e REINHOLD-HUREK, 2002). Vários trabalhos sugerem que a glutamina é o sinal que desencadeia o desligamento da nitrogenase em resposta à adição de amônio ao meio, porém a glutamina não parece estar envolvida no desligamento em resposta a anaerobiose e falta de luminosidade (ZHANG *et al.*, 1997; NORDLUND, 2000).

As enzimas DraT e DraG de *A. brasilense* são codificadas pelos genes *draTG*, que são expressos constitutivamente e formam um operon em *A. brasilense* (ZHANG *et al.*, 1992). Apenas uma pequena região a jusante do gene *draG* foi seqüenciada, esta região contém os primeiros 14 códons de uma ORF similar a uma ORF que se apresenta à jusante de *draG* em *R. rubrum* denominada *draB* (ZHANG *et al.*, 1992). Em *R. rubrum* o produto do gene *draB* parece controlar parcialmente a atividade das proteínas DraT e DraG. Mutantes *draB* apresentam regulação da nitrogenase semelhante à observada na estirpe selvagem, porém o desligamento da nitrogenase é mais rápido em relação à estirpe selvagem (LIANG *et al.*, 1991).

O sistema de ADP-ribosilação da nitrogenase não é o único sistema de controle pós-traducional da nitrogenase em *A. brasilense*, a presença de um segundo mecanismo de controle foi sugerida (ZHANG *et al.*, 1996). Estes autores substituíram o resíduo de arginina 101 da proteína NifH (o resíduo que recebe o grupo ADP-ribose) por um resíduo de tirosina, as células contendo a proteína NifH mutada apresentaram uma redução de cerca de 40% na atividade da nitrogenase

em resposta a adição de amônio, o mesmo comportamento foi observado em um mutante *draT*, no qual não é observada ADP-ribosilação da proteína NifH (ZHANG *et al.*, 1996).

Figura 8 – Esquema da inativação reversível de NifH por ADP-ribosilação



Os dímeros da proteína NifH estão representados em azul, a letra R indica o resíduo de arginina 101, R-ADPR indica o resíduo Arg101 modificado por ADP-ribose

1.23.1 As proteínas DraT e DraG

As proteínas DraT e DraG foram purificadas e estudadas em *R. rubrum* (SAARI *et al.*, 1984; LOWERY e LUDDEN, 1988). A proteína DraT deste organismo é uma proteína monomérica com massa molecular de 30kDa. Está presente em baixos níveis dentro da célula (representa 0,002% da proteína total celular), o único substrato conhecido é a proteína NifH. A proteína DraT pode utilizar várias moléculas além do NAD^+ como doadores do grupo ADP-ribose (LOWERY e

LUDDEN, 1988), DraT é incapaz de agir sobre a proteína NifH que foi previamente desnaturada pela exposição ao oxigênio. Também foi demonstrado que DraT não é capaz de ligar NAD⁺, sugerindo que o sítio de ligação para NAD⁺ seja formado no complexo entre DraT e a proteína NifH (GRUNDWALD e LUDDEN, 1997).

A proteína DraG de *R. rubrum* é monomérica, possui massa molecular de 32kDa e apresenta um núcleo de manganês (SAARI *et al.*, 1984; NORDLUND, 2000). Como DraT, DraG está presente em pequenas quantidades dentro da célula (0,002% da proteína total). DraG catalisa a hidrólise da ligação entre o grupo ADP-ribose e a arginina 101 da proteína NifH de *R. rubrum*, esta reação é dependente de MgATP e um cátion divalente como Mn²⁺ e Fe²⁺ (SAARI *et al.*, 1984). A ligação de Mn²⁺ parece ser essencial para a atividade da proteína uma vez que alterações em aminoácidos que levam à perda do núcleo de manganês tornam a proteína inativa (ANTHERAVALLY *et al.*, 2001).

A proteína DraG foi inicialmente descrita como sensível ao oxigênio (SAARI *et al.*, 1984), posteriormente foi demonstrado que a inativação de DraG pelo oxigênio ocorre devido à formação de espécies reativas de oxigênio devido à presença de ditionito e manganês durante as etapas de purificação. (HALBLEIB *et al.*, 2000b). DraG pode utilizar vários compostos ADP-ribosilados como substrato, até mesmo a proteína NifH desnaturada pelo oxigênio serve como substrato. A proteína DraG de *A. brasilense* também foi purificada, e como em *R. rubrum*, DraG de *A. brasilense* requer Mn²⁺ ou Fe²⁺ para sua atividade, também foi observado que a concentração de sal presente no ensaio afeta sua atividade *in vitro* (LJUNGSTROM, 1989).

Em 1977, NORDLUND e colaboradores observaram que a atividade de DraG estava associada à fração de membrana em *R. rubrum*. Os protocolos para purificação das proteínas DraG de *R. rubrum* e de *A. brasilense* utilizam a fração de membrana celular como material de partida para a purificação desta enzima (SAARI *et al.*, 1984; LJUNGSTROM, 1989).

1.23.2 Controle do desligamento/religamento da nitrogenase por ADP-ribosilação

Vários trabalhos indicam que as atividades de DraT e DraG são reguladas *in vivo*. Entretanto, o sinal metabólico responsável por tal controle não é totalmente conhecido (ZHANG *et al.*, 1997). As proteínas DraT e DraG mantêm sua atividade em extratos celulares o que sugere que suas atividades sejam reguladas pela ligação de efetores que se ligam fracamente a estas enzimas ou que sejam

degradados em extratos celulares.

Acredita-se que as proteínas DraT e DraG sejam ativadas e desativadas em momentos distintos durante o fenômeno de desligamento/religamento da nitrogenase, um esquema da atividade destas enzimas está representado na Figura 9. Antes da adição do efector do desligamento da nitrogenase (parte 1 do gráfico), DraT estaria inativa e DraG estaria ativa. Estas conclusões foram baseadas em estudos com mutantes *dra* em *R. rubrum*, mutantes *draG* apresentam atividade da nitrogenase elevada até a adição do efector do desligamento, isto sugere que a proteína DraT esteja inativa em condições de fixação de nitrogênio (LIANG *et al.*, 1991). Quando o efector é adicionado a DraT se torna ativa e DraG é inativada (parte 2 do gráfico). DraT permanece ativa por um curto período enquanto que DraG permanece inativa até o desaparecimento do efector negativo (parte 3 do gráfico). Estas conclusões foram baseadas em dados que indicaram que o desligamento da nitrogenase em *R. rubrum* nunca é total (aproximadamente 10% da atividade da nitrogenase é mantida), isto sugere que DraT totalmente ativa e DraG totalmente inativa não estão presentes simultaneamente na célula. Outro dado que corrobora este modelo é que não foi detectado a retirada de ADP-ribose ligada à NifH durante o desligamento da nitrogenase, indicando que DraG permanece inativa neste período (KANEMOTO e LUDDEN, 1984). Durante a recuperação da atividade da nitrogenase DraG é ativada e permanece ativa (parte 4 do gráfico). O estímulo para a modificação da proteína NifH esta relacionada com os níveis de nitrogênio da célula (adição de amônio) ou ao estado energético da celular (anaerobiose/falta de luminosidade). Parece claro que os passos iniciais das vias que regulam as atividades de DraT e DraG são distintas para os diferentes sinais, porém ainda não está claro se e onde tais vias se sobrepõe (NORDLUND, 2000). Apesar dos fatores que influenciam a atividade de DraT e DraG não serem totalmente conhecidos, é bem provável que sejam similares em diferentes organismos. Esta hipótese é suportada pelo fato de que a expressão das enzimas DraT e DraG de *A. brasilense* em mutantes *draT* e/ou *draG* em *R. rubrum* re-estabelece o fenótipo selvagem e vice-versa (ZHANG *et al.*, 1995).

1.23.3 Papel de proteínas P_{II} e Amt no controle do desligamento/religamento da nitrogenase por ADP-ribosilação

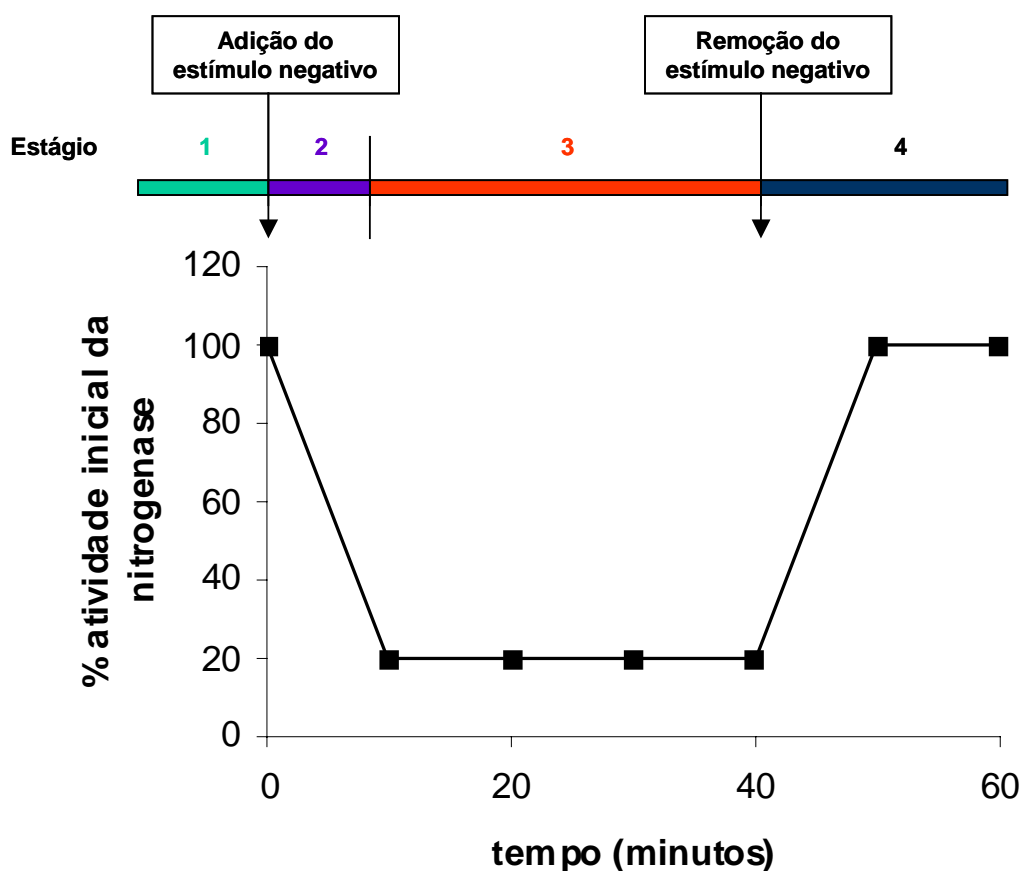
Vários trabalhos sugerem a participação das proteínas P_{II} e AmtB no controle

da modificação pós-traducional da nitrogenase em diferentes organismos. Em *R. capsulatus* um duplo mutante *glnBglnK* ou mutante *amtB* não apresenta ADP-ribosilação da proteína NifH (DREPPER *et al.*, 2003; YAKUNIN e HALLENBECK, 2002). Um duplo mutante *glnBglnJ* de *R. rubrum* não é capaz de ADP-ribosilar a proteína NifH em resposta a amônio e a falta de luminosidade (ZHANG *et al.*, 2001). Em *Azoarcus* sp. as proteínas GlnZ, GlnB e AmtB são necessárias para que ocorra modificação da proteína NifH em resposta a adição de amônio (MARTIN e REINHOLD-HUREK, 2002).

Proteínas da família P_{II} também parecem estar envolvidas no controle da atividade da nitrogenase em *A. brasilense*. O mutante *glnZ* de *A. brasilense* é capaz de desligar a atividade da nitrogenase em resposta ao aumento da concentração de amônio, porém é deficiente na recuperação da atividade após a exaustão do amônio do meio (KLASSEN *et al.*, 2001). Por outro lado, uma estirpe mutante *glnB* não é capaz de realizar o desligamento total da nitrogenase após a adição de amônio ao meio de cultura (KLASSEN *et al.*, 2005).

Os trabalhos, citados anteriormente, deixam claro que proteínas da família P_{II} e Amt têm um importante papel na via de transdução de sinal que regula a atividade das enzimas DraT e DraG. Entretanto, o mecanismo pelo qual estas proteínas podem controlar a atividade de DraT e DraG ainda não é conhecido. Em trabalhos recentes foram observadas interações entre as proteínas GlnB e DraT e GlnZ e DraT de *R. capsulatus* e GlnB e DraT em *R. rubrum* através do sistema de dois-híbridos de levedura (PAWLOWSKI *et al.*., 2003; ZHU *et al.*, 2006), sugerindo que as proteínas da família P_{II} podem regular DraT e DraG através de interações proteína-proteína.

Figura 9 – Regulação da atividade de DraT, DraG e NifH durante o desligamento/religamento da nitrogenase



Estágio (condição)	Atividade de DraT	Atividade de DraG	Proteína NifH
1 (fixação de nitrogênio)	Inativa	Ativa	Ativa
2 (adição do estímulo negativo)	Torna-se ativa e perde a atividade	Inativa	Inativa (ADP-ribosilada)
3 (período após adição do estímulo negativo)	Inativa	Inativa	Inativa (ADP-ribosilada)
4 (remoção do estímulo negativo)	Inativa	Ativa	Ativa (remoção de ADP-ribose)

O gráfico indica um experimento idealizado de desligamento/religamento da nitrogenase e das atividades de DraT, DraG e NifH (Tabela). Em condições de fixação de nitrogênio (estágio 1), DraT está inativa e DraG está ativa conseqüentemente, a proteína NifH não está modificada. Após a adição do estímulo negativo (estágio 2), DraT é ativada e DraG inativada, resultando na ADP-ribosilação de NifH e, conseqüentemente, queda na atividade da nitrogenase. DraT é

ativada apenas transitoriamente, no período logo após a adição do estímulo negativo (estágio 3), DraT e DraG estão inativas, portanto, uma atividade residual da nitrogenase é mantida. Após a remoção do estímulo negativo (estágio 4), DraG é ativada e remove o grupo ADP-ribose de NifH restaurando a atividade da nitrogenase

1.23.4 Regulação da atividade de DraT e DraG pelo estado de oxi-redução da proteína NifH

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a atividade das proteínas DraT e DraG é controlada pelo estado de oxi-redução da proteína NifH (HALBLEIB *et al.*, 2000a; HALBLEIB *et al.*, 2000b). Os trabalhos *in vitro* indicam que a proteína DraT é capaz de ADP-ribosilar apenas a forma oxidada de NifH enquanto que DraG reage apenas com a forma reduzida (HALBLEIB *et al.*, 2000b). Corroborando este resultado foi observado *in vivo* que mutantes *nifD* de *R. rubrum* tem um padrão de ADP-ribosilação da proteína NifH mais lento que o observado na estirpe selvagem. Devido à ausência de aceptor de elétrons (*nifD*), a proteína NifH neste mutante deve estar predominantemente em sua forma reduzida, se tornado assim um fraco substrato para DraT (HALBLEIB *et al.*, 2000b).

Utilizando o sistema heterólogo de *K. pneumoniae* (duplo mutante *niJ nifF* de *K. pneumoniae* expressando *draT* e *draG* de *R. rubrum*) HALBLEIB e colaboradores (2000a) observaram que mutações nos genes que codificam para proteínas que transportam elétrons para a proteína NifH (*nifJ* e *nifF*) apresentam um padrão de desligamento da nitrogenase muito mais rápido que o observado na estirpe selvagem. Este resultado confirma a hipótese de que a proteína DraT atua preferencialmente sobre a proteína NifH oxidada (HALBLEIB *et al.*, 2000a).

Apesar do estado de oxi-redução da proteína NifH ter um papel importante no controle da atividade de DraT e DraG, ele não pode ser o único meio de regulação *in vivo*, já que no sistema de *K. pneumoniae* (mutantes *niJ* e *nifF* expressando *draT* e *draG* de *R. rubrum*) a inabilidade de reduzir NifH não é suficiente para causar a inativação da nitrogenase (HALBLEIB *et al.*, 2000a). Além disso as proteínas DraT e DraG não são reguladas de maneira coordenada como descrito anteriormente, ambas as proteínas podem estar inativas em algumas condições sugerindo que a regulação de DraT e DraG deve envolver outros fatores (HALBLEIB *et al.*, 2000a).

1.23.5 Controle de DraG por interação com proteínas de membrana ?

A proteína DraG foi originalmente isolada da fração de membrana de *R.*

rubrum. Durante a purificação da DraG foi observado que esta proteína está fracamente associada à fração de membrana podendo ser liberada em solução com alta força iônica (SAARI *et al.*, 1984). HALBLEIB e LUDDEN (1999) observaram que a proteína DraG de *R. rubrum* é capaz de se associar com a fração de membrana de diversos organismos diazotróficos, mesmo em organismos onde os genes *draTG* não foram encontrados. Estes mesmos autores concluíram que a associação da proteína DraG com a fração de membrana provavelmente ocorre por meio de um componente protéico. Em *R. rubrum*, nucleotídeos como GTP e GDP podem dissociar a proteína DraG da fração de membrana em concentrações fisiológicas (NORÉN e NORDLUND, 1997; HALBLEIB e LUDDEN, 1999), como a proteína DraG parece ser incapaz de ligar GTP ou GDP, foi sugerido que a associação/dissociação de DraG com a fração de membrana ocorreria por intermédio de uma proteína similar a proteína G de organismos eucariotos (HALBLEIB e LUDDEN, 1999; NORDLUND, 2000). O papel fisiológico da associação da DraG com a membrana não é conhecido uma vez que DraG é ativa tanto na presença quanto na ausência da fração de membrana (HALBLEIB e LUDDEN, 1999).

O mecanismo que controla a atividade das proteínas DraT e DraG parece envolver uma série de fatores como proteínas da família P_{II}, proteínas da família Amt, interação direta entre DraT e DraG (GRUNWALD *et al.*, 1995), potencial de redox da célula (NORDLUND, 2000), atividade da glutamina sintetase (NORDLUND, 2000), estado redox da proteína NifH (HALBLEIB *et al.*, 2000a; HALBLEIB *et al.*, 2000b; EGNER *et al.*, 2001). Alguns modelos para a regulação da atividade de DraT e DraG foram propostos (NORDLUND, 2000; HALBLEIB *et al.*, 2000), porém, estes modelos não previam a participação de proteínas da família P_{II} e Amt. O esclarecimento do papel das proteínas P_{II} e AmtB no controle das enzimas DraT e DraG em *A. brasilense* é um dos objetivos deste trabalho.

1.24 Promotores *glnBp1* e *glnBp2* de *A. brasilense*

O gene que codifica para glutamina sintetase em *A. brasilense* foi isolado de uma biblioteca genômica por complementação de mutantes Gln⁻ Nif⁻ e Gln⁻ Nif^c (BOZOUKLIAN e ELMERICH, 1986) (Nif^c indica fixação de nitrogênio na presença de amônio, Nif⁻ indica incapacidade de fixar nitrogênio e Gln⁻ indica auxotrofia para glutamina). O plasmídeo capaz de complementar os dois mutantes continha o gene *glnA* que codifica para GS. Após o sequenciamento do gene *glnA*, nenhuma

seqüência consenso de promotor tipo σ^N ou σ^{70} foi encontrada a montante da região codificadora (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990). Estes resultados sugeriam que a transcrição do gene *glnA* de *A. brasilense* fosse diferente de qualquer outro sistema até então descrito.

O sequenciamento da região a montante do gene *glnA* indicou a presença de uma ORF homóloga ao gene *glnB*, que codifica a proteína P_{II} (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990). Ensaio de hibridização de RNA revelaram que o gene *glnA* pode ser co-transcrito com o gene *glnB* ou transcrito independentemente. A transcrição do gene *glnA* como uma unidade monocistrônica ocorre predominantemente na presença de amônio, enquanto que sob condições de fixação de nitrogênio o gene *glnA* é predominantemente co-transcrito com *glnB* (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990).

Durante a identificação da região de início da transcrição do operon *glnBA* foi observada a presença de dois transcritos diferentes, dependendo da condição fisiológica testada. Em condições de fixação de nitrogênio um único transcrito foi identificado e denominado de RNA2. Seu início está localizado 11pb a jusante da seqüência TGGCACG - N₄ – GTGCTT que é consenso para reconhecimento pela σ^N da RNA polimerase, esta região foi denominada *glnBp2* (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990) (Figura 10). Em bactérias cultivadas em 2mM de NH₄Cl foi observada a presença de 2 transcritos com igual intensidade. Um sinal referente ao RNA2 e um segundo transcrito denominado de RNA1. Em altas concentrações de amônio (20mM) o único transcrito observado foi o RNA1. O início do RNA1 está localizado a 8 pb de uma seqüência promotora do tipo σ^{70} denominada *glnBp1* (Figura 10). Três possíveis sítios para ligação da proteína NtrC foram identificados na região promotora do gene *glnB*, duas destas seqüências se sobrepõe ao promotor *glnBp1* (HUERGO, 2002) (Figura 10).

Figura 10 – Seqüência da região promotora do gene *glnB* de *A. brasilense*

```

-365 GAGCTCTACCAACTGAGCTACCACCGCCACCGGGGTCGCCTATTTGCCCCAAGGGACGGG
-305 GCGGGTCAAGCTCTATTTTCCACCTTGTCCATCAATGTGAAAAGCCGGGTGGAAAGCCGG
                                     NtrC UAS - 1           NtrC UAS - 2
-245 CGCTACCCCATCCGAACGGACAAGGCTGCGCGGATTGCTTGCAGCATGTGCACAAATATT
                                     NtrC UAS - 3
-185 GTTCACTTCGCCCTATCCGTTGGCAGTCGCGTGCCGCCCACGGTGGCATCGGCCCGCTGC
-125 GGCCCGGCATCCACGCAGCCGGATCGCAACCGCTCCGATTGGCACGCAACGTGCTTTAC
-65  ATCGGAACCGTCGGCAGAGGCCTGGACGGTGCCTGCCGACGTTGGCACCTCGTACACGAGA
-5   GACCCATGAAGAAGATCGAAGCCATCATTAAGCCGTTCAAACTCGACGAAGTGAAGGAAG
  
```

Os 2 sítios de início de transcrição estão indicados em negrito e sublinhados. As regiões -35 e -10 do promotor *glnBp1* (σ^{70}) estão indicadas em azul e sublinhadas. Os 3 possíveis sítios para NtrC estão indicados por barras horizontais. O promotor *glnBp2* (σ^N) está indicado em verde e sublinhado. Um provável elemento UP está sublinhado e em itálico. O sítio de ligação de ribossomo está em rosa e o início de tradução em vermelho

Estudos com fusões traducionais *glnB-lacZ* em mutantes *ntrC* indicavam que a proteína NtrC não estaria envolvida na regulação dos promotores *glnB* em *A. brasilense* (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Entretanto, foi observado que o mutante *A. brasilense* FP9 (mutante químico *ntrC*, obtido por PEDROSA e YATES em 1984, com fenótipo Nif⁻) apresenta baixa expressão de *glnB* independente da concentração de amônio no meio. O fenótipo Nif⁻ do mutante FP9 pode ser explicado pela baixa expressão da proteína GlnB, já que esta proteína é essencial para fixação de nitrogênio em *A. brasilense* (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Um fato curioso é que o fenótipo Nif⁺ deste mutante é parcialmente restaurado pela expressão constitutiva do

gene *ntrC* (PEDROSA e YATES, 1984; MACHADO *et al.*, 1995). A restauração do fenótipo Nif⁺ requer a expressão de *glnB*.

Apesar de DE ZAMAROCZY e colaboradores (1993) não terem observado efeito da proteína NtrC sobre a expressão do gene *glnB* outros estudos realizados (HUERGO, 2002) sugerem um papel da proteína NtrC na regulação da expressão deste gene através das seguintes evidências: Deleções dos sítios para NtrC UAS 1 e 2 reduzem a atividade do promotor *glnB* para níveis basais em limitação de nitrogênio; A proteína NtrC de *A. brasilense* foi capaz de ativar a transcrição do promotor *glnB* quando expressa simultaneamente com NtrB em *E. coli*; A proteína NtrC de *E. coli* foi capaz de se ligar à região promotora do gene *glnB* de *A. brasilense*. O esclarecimento da contradição sobre o envolvimento de NtrC no controle da expressão de *glnB* em *A. brasilense* é um dos objetos de estudo deste trabalho.

1.25 Promotor *glnAp* de *A. brasilense*

O mapeamento do início de transcrição do gene *glnA* como unidade monocistrônica indicou que o terminal 5' do transcrito estava localizado a 21pb a jusante de uma sequência semelhante a um possível promotor σ^N , exceto por uma mudança na posição -33 (G que aparece em 100% dos promotores já identificados substituído por T). Esta possível região promotora foi denominada de *glnAp* (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990). Além da troca de base, a distância entre o possível promotor e o local de início de transcrição é 9pb maior de que o observado normalmente em promotores σ^N . O *glnAp* é sobreposto a um possível sítio de ligação para NtrC (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990). DE ZAMAROCZY e colaboradores realizaram estudos mais detalhados sobre o *glnAp* em 1993. Utilizando fusões traducionais do promotor nativo em diferentes estirpes estes autores concluíram que a proteína NtrC não está envolvida na transcrição do gene *glnA*, entretanto uma redução na atividade da GS total é observada em mutantes *ntrB* e *ntrC* (ZHANG *et al.*, 1994). Por meio de deleções na região referente ao promotor *glnAp* e pela reconstituição do consenso para σ^N do possível promotor (troca do T na posição -33 por G) os autores concluíram que o fator σ^N não estava envolvido na regulação da transcrição do gene *glnA*.

1.26 Estrutura e regulação do operon *glnBA* em outros organismos

A disposição dos genes *glnB* e *glnA* em um mesmo operon (*glnBA*) parece ocorrer freqüentemente entre os membros da subdivisão α das proteobactérias. O operon *glnBA* foi identificado em *A. brasilense* (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990), *Rhodospirillum rubrum* (JOHANSSON e NORDLUND, 1996), *Rhodobacter capsulatus* (KRANZ *et al.*, 1990), *Rhodobacter sphaeroides* (ZINCHENKO *et al.*, 1994), *Azorhizobium caulinodans* (MICHEL-REYDELLET *et al.*, 1997), *Bradyrhizobium japonicum* (MARTIN *et al.*, 1989), *Rhizobium leguminosarum*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Rhizobium etli* e *Sinorhizobium meliloti*. Em *Herbaspirillum seropedicae*, um membro da subdivisão β das proteobactérias, o gene *glnA* faz parte de um operon com os genes *ntrBC* como ocorre em *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli*, membros da subdivisão γ das proteobactérias (PERSUHN *et al.*, 2000). Em *E. coli*, a expressão do operon *glnAntrBC* é controlada pelos níveis de nitrogênio e pela fonte de carbono utilizada (TIAN *et al.*, 2001). Apesar da conservação do operon *glnBA* dentro da subdivisão α das proteobactérias sua regulação é bastante variável.

R. leguminosarum e *S. meliloti* possuem promotores a montante dos genes *glnB* e *glnA*. O promotor *glnA* não apresenta seqüência consenso característica de nenhum promotor descrito mas a região promotora do gene *glnB* possui seqüência consenso de promotores σ^N . A expressão de *glnB* e *glnA* é parcialmente dependente de NtrC, mas não foi identificado nenhum sítio para ligação de NtrC (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001; ERCOLANO *et al.*, 2001). Apenas em *R. leguminosarum* os genes são co-transcritos.

Em *B. japonicum*, *glnB* e *glnA* são quase totalmente expressos de forma separada. O gene *glnA* é expresso constitutivamente a partir de um promotor σ^{70} . Apesar do gene *glnB* ser expresso a partir de um promotor σ^{70} em altas concentrações de nitrogênio fixado, e a partir de um promotor σ^N em condições de limitação de nitrogênio fixado, existe pouca variação na quantidade de transcrito *glnB* em resposta a variação de nitrogênio fixado. A proteína NtrC atua como ativadora do promotor *glnB* σ^N e como repressora do promotor *glnB* σ^{70} em baixas concentrações de nitrogênio fixado (MARTIN *et al.*, 1989).

Os genes *glnB* e *glnA* são co-transcritos a partir de dois promotores em *R. capsulatus*. O primeiro promotor é reprimido enquanto que o segundo é ativado por

NtrC (KRANZ *et al.*, 1990; FOSTER-HARTNETT e KRANZ, 1994). A expressão do gene *glnB* ocorre em níveis mais elevados na presença de nitrogênio fixado (BORGHESE e WALL, 1995). Para explicar as diferentes taxas de expressão dos genes *glnB* e *glnA* foi sugerido um evento de processamento do transcrito *glnBA* (BORGHESE e WALL, 1995).

Em *R. rubrum*, *glnB* e *glnA* são co-transcritos por um promotor fraco do tipo σ^{70} e por um promotor forte tipo σ^N . A proteína NtrC aumenta a expressão do promotor σ^N em condições de fixação de nitrogênio (CHENG *et al.*, 1999). O gene *glnA* parece ser expresso apenas a partir dos promotores do gene *glnB*, a presença de um RNA correspondente apenas ao transcrito *glnA* foi justificada por um processamento do RNA *glnBA* (CHENG *et al.*, 1999). Como em *R. rubrum* e em *R. capsulatus*, os genes *glnB* e *glnA* de *A. caulinodans* são co-transcritos (MICHEL-REYDELLET *et al.*, 1997). Em *A. caulinodans* foi identificado um promotor do tipo σ^N a montante da região codificadora do gene *glnB*, este promotor é ativado por NtrC em limitação de nitrogênio, um segundo promotor não identificado mantém altos níveis de expressão do operon em altas concentrações de amônio (MICHEL-REYDELLET *et al.*, 1997).

2. JUSTIFICATIVA

Este trabalho tem como principais objetivos o estudo da regulação da expressão do gene *glnB*, bem como o esclarecimento do papel das proteínas P_{II} e AmtB na regulação da atividade das enzimas DraT e DraG. A determinação do modo de regulação dos promotores *glnB* responsáveis pela expressão de proteínas chaves na regulação da fixação de nitrogênio e assimilação de amônio (GlnB e GlnA), e um maior entendimento sobre os sinais que controlam a atividade pós-traducional da nitrogenase são requisitos necessários para maior compreensão do processo de fixação de nitrogênio em *A. brasilense*. Estes estudos podem futuramente contribuir para o desenvolvimento de bactérias mais eficientes no fornecimento de nitrogênio fixado às plantas associadas.

3. OBJETIVOS

- Determinar o papel da proteína NtrC na regulação da expressão do operon *glnBA* de *A. brasilense*.
- Determinar as bases moleculares do fenótipo das estirpes FP8 e FP9 de *A. brasilense*.
- Purificar as proteínas DraT, DraG e NifH de *A. brasilense*.
- Produzir anticorpos policlonais para as proteínas DraT, DraG e NifH de *A. brasilense*.
- Determinar o efeito da superexpressão das proteínas DraT e DraG sobre o desligamento da nitrogenase em *A. brasilense*.
- Determinar o estado de modificação pós-traducional das proteínas NifH, GS, GlnB e GlnZ em resposta à adição de amônio na estirpe selvagem.
- Obter uma estirpe mutante *glnB* não polar.
- Determinar o efeito da ausência das proteínas GlnB, GlnZ e AmtB na modificação pós-traducional da proteína NifH.
- Determinar a localização celular da proteína DraG em resposta à adição de amônio ao meio de cultura.
- Testar possíveis interações *in vivo* entre as proteínas DraT – GlnB, DraT – GlnZ, DraG – GlnB e DraG – GlnZ.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactérias e plasmídeos

As bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listadas na Tabela

1.

Tabela 1 - Bactérias e plasmídeos

Estirpes	Propriedades	Referência ou Fonte
<i>A. brasilense</i>		
FP2	Nal ^r Sm ^r Estirpe selvagem, SP7 Nif ⁺	Pedrosa e Yates, 1984
FP8	Nal ^r Sm ^r FP2 Nif ⁻ <i>ntrC</i> ⁻	Pedrosa e Yates, 1984
FP9	Nal ^r Sm ^r FP2 Nif ⁻ <i>ntrC</i> ⁻	Pedrosa e Yates, 1984
LHNTRC3	Nal ^r Sm ^r Km ^r Nif ⁺ <i>ntrC::km</i>	Este trabalho
LHNTRC5	Nal ^r Sm ^r Km ^r Nif ⁺ <i>ntrC::km</i>	Este trabalho
HDK1	Nal ^r Sm ^r Km ^r Nif ⁺ $\Delta nifR3ntrBC::km - lacZ$	Machado <i>et al.</i> , 1995
UB2	Nal ^r Km ^r Nif ⁺ <i>draT::km</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1992
UB4	Nal ^r Km ^r Nif ⁺ <i>draG::km</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1992
FAJ310	Nal ^r Km ^r Nif ⁺ <i>amtB::km</i>	Van Dommelen <i>et al.</i> , 1998
7628	Nal ^r Km ^r Nif ⁻ <i>glnB::km</i>	de Zamaroczy <i>et al.</i> , 1996
7611	Nal ^r Sm ^r Nif ⁺ <i>glnZ::Ω</i>	de Zamaroczy <i>et al.</i> , 1998
2812	Nal ^r Sm ^r Km ^r Nif ⁻ <i>glnB::km glnZ::Ω</i>	de Zamaroczy <i>et al.</i> , 1998
LFH2	Nal ^r Km ^r Apra ^r estirpe merodiplóide <i>glnB::km + glnB::scar</i> ⁻	Este trabalho
LFH3	Nal ^r Nif ⁻ estirpe derivada de LFH2 $\Delta glnB$	Este trabalho
<i>E. coli</i>		
S17.1	Sm ^r Tra ⁺	Simon <i>et al.</i> , 1983
BW25113	derivada da estirpe K12: <i>araBAD</i> , <i>rhaBAD</i>	Datsenko e Wanner, 2000
DH10B	Sm ^r , F ⁺ [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> ΔM15]	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
FT8000	ET8000 derivada $\Delta glnB \Delta glnK$	Reyes-Ramirez <i>et al.</i> , 2001
Plasmídeos		
pAB448	Tc ^r (pBR322) <i>A. brasilense glnBA</i> 5.3-kb <i>EcoRI-PstI</i>	Bozouklian e Elmerich, 1986
pAB904	Tc ^r (-322/+290) <i>A. brasilense glnBp1p2-lacZ</i> fusão traducional	de Zamaroczy <i>et al.</i> , 1993
pAB912	Tc ^r (-315/+236) <i>A. brasilense glnAp-lacZ</i> fusão traducional	de Zamaroczy <i>et al.</i> , 1993
pCP20	Cb ^r Cm ^r FLP ⁺ , λ I857 ⁺ , λ p _R Rep ^{ts}	Cherepanov e Wackernagel, 1995
pDK7	Cm ^r <i>ptac lacI</i> ^q	Kleiner <i>et al.</i> , 1988
pEMS136	Tc ^r (pLAFR3.18) expressa NifA de <i>H. seropedicae</i> N-truncada	Souza <i>et al.</i> , 1999

pET28a pFAJ309	Km ^r vetor de expressão promotor T7 Tc ^r (pLAFR3) expressa o gene <i>amtB</i> de <i>A. brasilense</i> a partir do promotor <i>amtB</i>	Novagen van Dommelen <i>et al.</i> , 1998
pIJ773 pIJ784 pIJ790	Apra ^r P1-FRT- <i>oriT-aac(3)IV</i> -FRT-P2 Apra ^r <i>bla-oriT-aac(3)IV-bla</i> Cm ^r λ-RED (gam, bet, exo), <i>cat</i> , <i>araC</i> , rep101 ^{ts}	Gust <i>et al.</i> , 2003 Keith F. Chater Gust <i>et al.</i> , 2003
pJC1	Tc ^r (pLAFR3.18) expressa o gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> a partir do promotor <i>plac</i>	Vitorino <i>et al.</i> , 2001
pLAFR3.18	Tc ^r IncP Vetor de clonagem de baixo número de cópias, <i>plac</i>	Machado <i>et al.</i> , 1995
pLFH7	Cb ^r (pTZ19R) <i>A. brasilense glnBA</i> 5.3-kb <i>EcoRI-PstI</i> fragmento do pAB448	Este trabalho
pLFH8	Cb ^r Apra ^r pLFH7 contem um cassete <i>apraoriT</i> inserido na região codificadora do gene <i>glnB</i>	Este trabalho
pLFH9	Cb ^r pLFH8 contém a versão scar do gene <i>glnB</i>	Este trabalho
pLFH10	Apra ^r pLFH9, versão resistente a apramicina	Este trabalho
pLHC7	Amp ^r (pTZ19R) (-285/+268) <i>A. brasilense glnBp</i>	Huergo, 2002
pLHDK7DRAG	Cm ^r , (pDK7) Expressa proteína His-DraG de <i>A. brasilense</i> promotor <i>ptac</i> .	Este trabalho
pLHDK7DRAT	Cm ^r , (pDK7) Expressa proteína His-DraT de <i>A. brasilense</i> promotor <i>ptac</i>	Este trabalho
pLHDK7DRATG	Cm ^r , (pDK7) Expressa as proteínas His-DraT e DraG de <i>A. brasilense</i> promotor <i>ptac</i>	Este trabalho
pLHDRAGhisMP	Cm ^r Tc ^r pLHDK7DRAG. Cointegrado com pMP220	Este trabalho
pLHDRAThisMP	Cm ^r Tc ^r pLHDK7DRAT. Cointegrado com pMP220	Este trabalho
pLHDRAThisGMP	Cm ^r Tc ^r pLHDK7DRATG. Cointegrado com pMP220	Este trabalho
pLHFP9NTRC	Tc ^r (pLAFR3.18) Expressa o gene <i>ntrC</i> da estirpe <i>A. brasilense</i> FP9 promotor <i>plac</i>	Este trabalho
pLHglnBσN	Amp ^r (pTZ19R) (-285/+268) <i>A. brasilense glnBp2</i> mutagenizado (GG/AA)	Este trabalho
pLHMglnA	Tc ^r (pMP220) (-340/+554) <i>A. brasilense glnAp-lacZ</i> fusão transcricional	Huergo, 2002
pLHPETDRAG	Km ^r (pET28a) Expressa a proteína His-DraG de <i>A. brasilense</i> promotor T7	Este trabalho
pLHPETDRAT	Km ^r (pET28a) Expressa a proteína His-DraT de <i>A. brasilense</i> promotor T7	Este trabalho

pLHPETDRATG	Km ^r (pET28a) Expressa as proteínas His-DraT e DraG de <i>A. brasilense</i> promotor T7	Este trabalho
pLHPETNIFH	Km ^r (pET28a) Expressa a proteína His-NifH de <i>A. brasilense</i> promotor T7	Este trabalho
pLHR3BCKm	Cm ^r Amp ^r Km ^r pSHR3BC contendo o cassete <i>km</i> no sítio <i>Bgl</i> III do gene <i>ntrC</i> de <i>A. brasilense</i>	Este trabalho
pLHWC7	Tc ^r (pPW452) (-285/+268) <i>A. brasilense glnB</i>	Huergo, 2002
pLHWglnB	Tc ^r (pPW452) (-365/+268) <i>A. brasilense glnBp1p2-lacZ</i> fusão transcricional	Huergo, 2002
pLHWglnBσN	Tc ^r (pPW452) (-285/+268) <i>A. brasilense glnBp2</i> mutagenizado (GG/AA)	Este trabalho
pMA-tc 9.1	Amp ^r Km ^r (pCR4-blunt-TOPO) Fragmento de 1,7kb do gene <i>ntrC</i> de <i>A. brasilense</i> FP9	Assumpção, 2002
pMP220	Tc ^r Vetor para fusão transcricional <i>lacZ</i>	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pPW452	Tc ^r Derivado do pMP220 com o sítio de policlonagem invertido.	P. Woodley
pSHR3BC	Cm ^r Amp ^r (pSUP202). Contém o operon <i>nifR3-ntrBC</i> de <i>A. brasilense</i>	Machado <i>et al</i> , 1995
pTH6+	Amp ^r (pTZ18R) Contém o gene <i>ntrC</i> de <i>A. brasilense</i>	Machado, 1995
pTZ18R	Amp ^r pTZ19R com sítio de policlonagem invertido.	Mead <i>et al.</i> , 1986
pTZ19R	Amp ^r	Mead <i>et al.</i> , 1986
pUC4KIXX	Amp ^r Km ^r fonte do cassete <i>km</i>	GE Healthcare

4.2 Reagentes

Lisozima, o-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo (ONPG), Tris base, glicerol, SDS, acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amônio, TEMED, e os antibióticos foram adquiridos da Sigma Chemical Company. Alguns géis de policrilamida foram preparados usando uma solução de acrilamida 30% (relação acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1) da Severn Biotech. Fenol, ágar e agarose foram adquiridos da Invitrogen (Life-Technologies). EDTA, NaCl, NaOH, etanol, metanol, ácido acético, isopropanol, clorofórmio e álcool isoamílico foram adquiridos da Merck ou Reagen. As enzimas modificadoras de DNA e RNase foram adquiridas da GE Healthcare (GE – Healthcare), Gibco-BRL (Life-Technologies) ou New England Biolabs. Os nucleotídeos marcados radioativamente foram adquiridos da GE - Healthcare. Extrato de levedura, triptona e ágar bacteriológico foram adquiridos da Merck, Oxoid

ou Biobrás. Os demais reagentes utilizados foram provenientes de diversas fontes, todos eram reagentes analíticos.

4.3 Meios de cultura

4.3.1 Meios empregados para cultivo de *A. brasilense*

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFbHP (MACHADO *et al.*, 1991). A composição e o preparo do meio NFbHP estão descritos abaixo.

	gramas/litro
KH ₂ PO ₄	4,0
K ₂ HPO ₄	6,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	2,0 . 10 ⁻¹
NaCl	1,0 . 10 ⁻¹
CaCl ₂	2,0 . 10 ⁻²
Ácido nitrilo triacético	5,6 . 10 ⁻²
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,0 . 10 ⁻²
Lactato de sódio	5,0
Biotina	1,0 . 10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	2,0 . 10 ⁻³
MnSO ₄ . H ₂ O	2,35 . 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,8 . 10 ⁻³
CuSO ₄ . 5H ₂ O	8,0 . 10 ⁻⁵
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,4 . 10 ⁻⁴

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH₄Cl 20mM, glutamato 0,5mM ou KNO₃ 20mM. As soluções de fosfatos e cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas frias ao meio no momento de uso. Quando completo, o meio de cultura apresentou pH 6,8 e passou a ser denominado NFbHP. O meio NFbHP sólido foi obtido adicionando-se ágar bacteriológico na concentração de 15g/L ao meio líquido, dez por cento da mistura de fosfato foi adicionada ao meio sólido antes da autoclavação para evitar hidrólise do ágar devido a possíveis variações no pH. O meio NFbHP semi-sólido foi obtido misturando meio sólido e líquido na proporção de 1/9 no momento do uso.

4.3.2 Meios empregados para cultivo de *E. coli*

Os meios de cultura líquidos utilizados no cultivo das estirpes de *E. coli* foram Luria-Broth (LB), Terrific-Broth (TB), SOB e SOC.

O meio LB (SAMBROOK *et al.*, 1989) apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 2M. O meio sólido foi obtido a partir da adição de ágar na concentração de 15g/L ao meio líquido e foi denominado LA.

O meio TB (SAMBROOK *et al.*, 1989) apresenta a seguinte composição:

Extrato de levedura	24,0 g/L
Triptona	12,0 g/L
Glicerol	4,0 mL/L

Para preparo de células eletrocompetentes as estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio SOB (SAMBROOK *et al.*, 1989) Este meio apresenta a seguinte composição:

Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	0,6 g/L
KCl	0,186 g/L

O pH foi ajustado para 7 com NaOH 2M. O meio SOC foi obtido com a adição de glucose 3,6 g/L, MgCl₂ 0,94 g/L e MgSO₄ 1,2 g/L ao meio SOB

4.4 Antibióticos

Os antibióticos empregados e suas respectivas concentrações finais foram: ampicilina 200µg/mL, canamicina 100µg/mL, ácido nalidíxico 5µg/mL, tetraciclina 10µg/mL, carbenicilina 100µg/mL, apramicina 50µg/mL, cloranfenicol 30µg/mL e estreptomicina 20µg/mL para *E. coli* ou 100µg/mL para *A. brasilense*. As soluções estoque dos antibióticos foram preparadas como descrito por SAMBROOK *et al.*, 1989 e mantidas a 4°C.

4.5 Condições de cultivo

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFbHP contendo antibióticos adequados e NH₄Cl 20mM, glutamato 0,5mM ou KNO₃ 20mM como fonte de nitrogênio. As culturas em meio líquido foram incubadas em agitador rotatório a 120rpm. A atividade de β-galactosidase foi determinada em células cultivadas em duas condições: + NH₄ (NFbHP contendo NH₄Cl 20mM e glutamato 0,5mM) e - NH₄ (NFbHP contendo glutamato 0,5mM). As células de *A. brasilense* foram pré-inoculadas em meio NFbHP contendo NH₄Cl 20mM e antibióticos adequados até atingirem D.O₆₀₀ aproximadamente igual a 1. Em seguida foram transferidos 20μL desta cultura inicial para condição + NH₄ ou 200μL para condição - NH₄. As suspensões bacterianas foram incubadas a 30°C sob agitação de 150rpm durante 15 horas e então ensaiadas para atividade de β-galactosidase. Para ensaios de atividade de nitrogenase as células de *A. brasilense* foram cultivadas em meio NFbHP semi-sólido ou líquido conforme indicado em cada experimento.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C. As culturas em meio líquido foram incubadas em agitador rotatório a 200rpm. As células de *E. coli* foram mantidas em glicerol 50% e estocadas a -20°C. Estoques de *A. brasilense* foram mantidos em meio sólido a temperatura ambiente.

4.6 Amplificação de DNA por PCR

A amplificação de DNA foi realizada utilizando o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOCHER e WILSON, 1991). Os "primers" utilizados foram oligonucleotídeos sintetizados pela Invitrogen ou SigmaGenosis. Para a maioria das reações de amplificação foram utilizados: tampão de PCR (20mM Tris-HCl pH 8,4 e 50mM KCl), 0,2mM dNTPs, 20pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5mM MgCl₂, 0,75μL de DMSO, aproximadamente 20ng de DNA molde e 1μL de *Taq* DNA polimerase (purificada em nosso laboratório) em um volume final de reação de 25μL. Algumas reações de PCR foram realizadas usando-se a enzima *PfuTurbo* da Stratagene, seguindo especificações do fabricante. Vários parâmetros de ciclos de amplificação foram testados. Alternativamente, colônias isoladas ou culturas de células fervidas foram usadas como DNA molde nas reações de PCR.

4.7 Purificação de plasmídeo

A extração de plasmídeos foi realizada pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*,1989). Uma cultura de células, incubada durante a noite em meio LB ou TB, foi centrifugada a 13.000rpm por 30 segundos. O sedimento foi suspenso em tampão GET (50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8,0 e 10mM de EDTA pH 8,0) e a lise celular efetuada com a adição de 1% SDS e 0,2M NaOH. DNA cromossomal e proteínas foram precipitados com 3M acetato de potássio pH 4,8. Após incubação por 10 minutos em banho de gelo foram adicionados 100µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a amostra foi agitada em agitador de tubos sendo então centrifugada. A fase aquosa foi coletada e adicionada de 2 volumes de etanol 96% com a finalidade de precipitar o DNA plasmidial. A mistura foi centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em água. Alternativamente DNA plasmidial foi purificado usando-se o kit de purificação de plasmídeos da Novagem.

4.8 Clivagem de DNA com enzima de restrição

Endonucleases de restrição foram adquiridas da Invitrogen, GE Healthcare, Roche e New England Biolabs. As condições de reação foram aquelas sugeridas pelo fabricante.

4.9 Ligação de DNA

O DNA plasmidial linearizado foi misturado ao DNA inserto em tampão de ligação, aquecido a 60°C por 30 segundos e resfriado em banho de gelo. Foi adicionado ao sistema 0,5 a 2U de T4 DNA ligase, a mistura foi incubada a 16°C por pelo menos 16 horas.

4.10 Transformação bacteriana por eletroporação

4.10.1 Preparo de células

As células de *E. coli* foram tornadas competentes segundo procedimento recomendado pelo fabricante do eletroporador (Cell Porator – Life Technologies). Algumas colônias de *E. coli* crescidas em meio LA foram inoculadas em 5mL de meio SOB na presença de antibióticos, a cultura foi incubada sob agitação por cerca de 16 horas. Dois mililitros deste pré-inóculo foram transferidos para um frasco de 1L contendo 200mL de SOB mais antibióticos, esta cultura foi incubada a 37°C até

atingir densidade $D.O_{600}$ de entre 0,4 e 0,6. A cultura foi mantida no gelo por 15 minutos e centrifugada a 2.500g por 5 minutos a 4°C. As células foram lavadas duas vezes em 40mL de água destilada gelada estéril, centrifugadas, suspensas em 40mL de glicerol 10% gelado. Após nova centrifugação (sempre sob as mesmas condições), o glicerol foi removido por inversão do tubo e as células foram suspensas no restante da solução presente no tubo. As células foram aliquotadas (40μL) e congeladas a -70°C.

4.10.2 Eletroporação

Para eletroporação foram misturados 1μL da mistura de ligação ou 50ng de plasmídeo íntegro com 40μL de células eletrocompetentes previamente descongeladas em banho de gelo. A mistura foi transferida para a câmara de eletroporação com 0,15cm de distância entre os pólos e submetido a um único pulso elétrico de aproximadamente 4kΩ, 15kV/cm (voltagem aplicada/distância entre os eletrodos) por 6 milisegundos. Após o pulso elétrico foi adicionado 1mL de meio SOC à câmara de eletroporação. A suspensão de células foi transferida para um frasco estéril e incubada a 37°C por cerca de 40 minutos para recuperação. Alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio adequado.

4.11 Transformação bacteriana por choque térmico

4.11.1 Preparo de células

Algumas colônias de *E. coli* crescidas em meio LA foram inoculadas em 5mL de meio LB na presença de antibióticos, a cultura foi incubada sob agitação por cerca de 16 horas a 37°C. Todo o pré-inóculo foi transferido para um frasco de 1L contendo 250mL de LB mais antibióticos e a cultura foi incubada a 37°C até atingir densidade $D.O_{600}$ entre 0,3 e 0,4. As células foram deixadas no gelo por 30 minutos, centrifugadas a 3.000g por 10 minutos a 4°C, sendo então ressuspensas em 30mL de uma solução gelada de $CaCl_2$ 0,1M. Após 30 a 60 minutos no gelo as células foram coletadas por centrifugação (sob as mesmas condições), ressuspensas em 8mL de solução gelada de $CaCl_2$ 0,1M + 15% de glicerol. Frações de 200μL foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

4.11.2 Choque térmico

As alíquotas de células foram retiradas do freezer -80°C e mantidas no gelo por 30 minutos. Metade da reação de ligação (ou 50ng de plasmídeo purificado) foi misturada com as células, mantendo-se no gelo por 30 minutos, seguido de banho a 42°C por 2 minutos. As células foram imediatamente transferidas para o banho de gelo, suspensas em 1mL de LB, e recuperadas a 37°C por 40 minutos. Alíquotas foram plaqueadas em meio LA contendo antibióticos adequados.

4.12 Análise de plasmídeos recombinantes

Para verificação da presença de insertos clonados no vetor pTZ19R ou equivalente, foi utilizada a metodologia “Fast-preps”, descrita por MONTEIRO e colaboradores (2001). Duzentos microlitros de uma cultura de células, cultivadas por 16 horas em meio TB, foram transferidos para tubos tipo Eppendorf e centrifugados por 30 segundos. Após a retirada do meio de cultura às células foram ressuspensas em 30µL de solução RL (10% glicerol, 5µg/mL RNase, 0,05% azul de bromofenol) e lisadas com a adição de 10µL de SDS 10%. Para a precipitação de proteínas foram adicionados 3µL de KCl 3M seguido de incubação em gelo por 10 minutos, a mistura foi centrifugada a 13.000rpm por 5 minutos. A fração sobrenadante foi então submetida à eletroforese em gel de ágar 1,5%. Por meio deste procedimento, utilizando plasmídeo sem inserto como padrão, foi possível a determinação da presença ou não de inserto nos plasmídeos analisados. Alternativamente a presença de insertos em plasmídeos foi verificada por PCR utilizando como DNA molde colônias crescidas em placas de Petri diretamente na reação.

4.13 Eletroforese de DNA

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de ágar ou agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK *et al* (1989) com modificações. O DNA foi visualizado, após tratamento com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), em transluminador de luz ultravioleta. O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

4.14 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando didesoxirribonucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977) e um seqüenciador Automático de DNA (Applied Biosystems modelo 377). Neste sistema quatro cromóforos fluorescentes são utilizados como terminadores de cadeia, seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção a Laser. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o sistema ET terminator (GE Healthcare), os parâmetros de amplificação foram definidos de acordo com os iniciadores utilizados. Como DNA molde para as reações de sequenciamento foram utilizados plasmídeos purificados ou produtos de PCR.

Os plasmídeos molde para sequenciamento foram purificados como descrito no item 4.7. Após a ressuspensão em água, o DNA foi tratado por 2 horas com RNase 10µg/mL a 37°C. Foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) a amostra foi agitada em agitador de tubos sendo então centrifugada, a fase aquosa foi separada e adicionado 1 volume de clorofórmio. Após nova centrifugação, foram adicionados 2 volumes de etanol 96% a fase aquosa com a finalidade de precipitar o DNA plasmidial. A mistura foi centrifugada a 13000rpm por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspensão em água. O DNA purificado foi analisado em eletroforese de ágar, uma quantificação visual foi realizada utilizando um plasmídeo de concentração conhecida (pGEM – Promega). Cerca de 200 a 500ng de DNA plasmidial foram utilizados nas reações de sequenciamento.

Os produtos de PCR para reação de sequenciamento foram misturados com acetato de amônio 7,5M e etanol 96% na seguinte proporção (40µl da reação de PCR, 26µl de acetato de amônio, 133µl de etanol), a mistura foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos, sendo centrifugada 13.000rpm por 20 minutos. O DNA precipitado foi lavado 2X com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspensão em 40µl de água. 3µl do produto de PCR purificado foram utilizados como molde nas reações de sequenciamento.

4.14.1 Sequenciamento do gene *ntrC* das estirpes FP9 e FP8

O gene *ntrC* da estirpe FP9 foi amplificado por PCR utilizando o plasmídeo pLHFP9NtrC como DNA molde e os primers reverso e universal. Para sequenciar

todo o produto de PCR (1,7kb) em ambas as fitas foram utilizados 5 primers específicos além dos primers do vetor reverso e universal nas reações de sequenciamento. Os primers usados foram: Ntrc 2 (5' AAGCTGGACTTCCTCGA 3'), Ntrc 3 (5' GCGCTCCTGGACAAGAT 3'), Ntrc 6 (5' CGACGTGCTAATGCCGTT 3'), Ntrc F (5' TGACCTCTTGCGAATAGAGC 3'), Ntrc R (5' CTTCGTCGCGATCAACATGG 3'). A mutação encontrada no gene *ntrC* da estirpe FP9 foi confirmada pelo sequenciamento de um produto de PCR obtido com os primers Ntrc 1 (5'CTACGCAAGTAATGCTGC 3') e Ntrc 4 (5' CGAGGAATCCCTGACAC 3') e DNA obtido de uma cultura de células FP9 fervida como molde.

A seqüência do gene *ntrC* da estirpe FP8 foi obtida pelo sequenciamento direto de um produto de PCR obtido com os primers NtrC 1 e NtrC 4 e utilizando uma cultura de células da estirpe FP8 fervida como DNA molde. Os primers utilizados nas reações de sequenciamento foram os mesmos descritos anteriormente.

4.15 Transferência de plasmídeos por conjugação

Os plasmídeos a serem transferidos para as estirpes de *A. brasilense* foram mantidos em *E. coli* S17.1 (*tra*⁺). As estirpes de *A. brasilense* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas até saturação nos meios NFbHPN e LB, respectivamente. Cinco microlitros da cultura de *E. coli* foram utilizados para inocular 2mL de meio LB sem antibióticos, 100µL da cultura de *A. brasilense* foram utilizados para inocular 5mL de meio NFbHPN sem antibióticos. As culturas foram mantidas a 37°C e 30°C, respectivamente, sob agitação por 5 horas. Em seguida, 50µL de *A. brasilense* foram misturados com 5µL de *E. coli*, as células foram plaqueadas como uma gota em meio LA/NFbHPN (1:1) e incubadas a 30°C durante 20 horas. A massa de células foi raspada, suspensa em 1mL de NFbHP, diluída e plaqueada em meio NFbHP contendo NH₄Cl 20mM e os antibióticos adequados.

4.16 Purificação de DNA genômico de *A. brasilense*

Cem microlitros de uma cultura fresca de *A. brasilense* foram inoculadas em 10mL de meio líquido NFbHP contendo NH₄Cl 20mM, a cultura foi incubada a 30°C sob agitação por 18 horas, sendo transferida para tubos plástico tipo Ependorff e

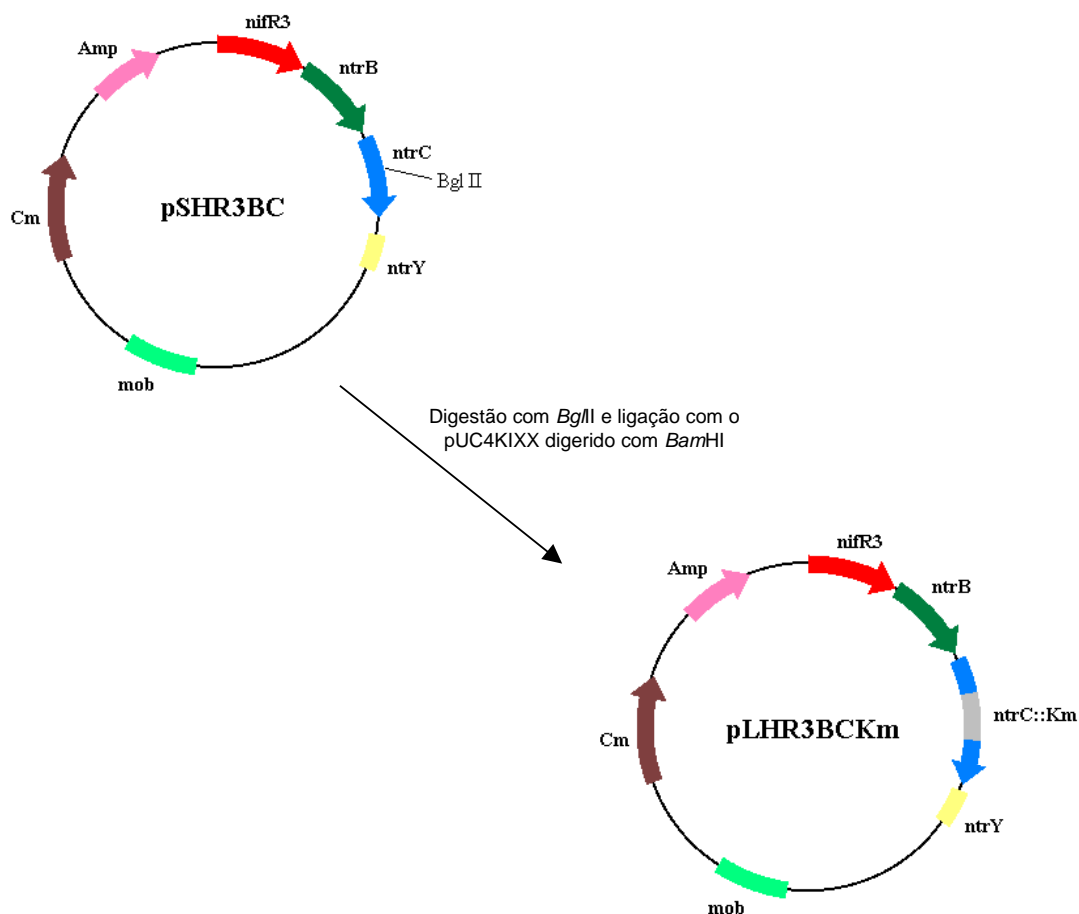
centrifugada a 13.000rpm por 1 minuto. As células foram lavadas com 1mL de tampão TES (Tris-HCl pH 8,0 50mM, EDTA pH 8,0 20mM, NaCl 200mM) e ressuspensas em 500µl de TES. Foi adicionado Lisozima a suspensão celular (concentração final de 100µg/mL), a mistura incubada a 30°C por 1 hora. Após este período, foram adicionados SDS (1% m/v) e proteinase K (50µg/mL), a mistura foi homogeneizada e incubada a 30°C por 16 horas.

A solução de DNA foi purificada com quatro extrações de 500µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e duas extrações com clorofórmio. Após as extrações, foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto para a precipitação do DNA, a solução foi centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado com 500µl de etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em 80µl de água contendo RNase 10µg/mL.

4.17 Obtenção de estirpes *A. brasilense* mutante *ntrC*

Um cassete de canamicina (fragmento de 1,4kb *Bam*HI derivado do plasmídeo pUC4KIXX) foi inserido no sítio *Bgl*II, localizado na região codificadora do gene *ntrC* de *A. brasilense*, presente no plasmídeo pSHR3BC (Figura 11).

Figura 11 – Esquema da obtenção do plasmídeo pLHR3BCKm



O plasmídeo pSHR3BC foi digerido com a enzima *Bgl*II e ligado ao cassete de canamicina do vetor pUC4KIXX previamente digerido com a enzima *Bam*HI. O plasmídeo recombinante produzido pLHR3BCKm possui o cassete de resistência inserido na região codificadora no gene *ntrC*.

O plasmídeo recombinante obtido (pLHR3BCKm) foi introduzido na estirpe FP2 de *A. brasilense* utilizando a linhagem S17.1 de *E. coli* como doadora. Onze colônias resistentes canamicina (500µg/mL) foram selecionadas, sendo que nove destas também apresentaram sensibilidade a cloranfenicol (30µg/mL) indicando que estas células sofreram inserções ocasionadas por eventos de dupla recombinação. Duas colônias sensíveis a canamicina e cloranfenicol foram selecionadas para caracterização posterior e as estirpes mutantes foram denominadas LHNTRC3 e LHNTRC5. A inserção correta do cassete de canamicina no gene *ntrC* foi confirmada por hibridização de DNA e complementação genética para crescimento em meio

NFbHP contendo nitrato de potássio (20mM) como única fonte de nitrogênio com o plasmídeo pLHC1 (expressa *ntrC* de *A. brasilense*).

4.18 Hibridização de DNA

4.18.1 Preparo da sonda

A sonda para a hibridização consistiu de um fragmento de 1,6kb correspondente a região codificadora do gene *ntrC* de *A. brasilense*. Este fragmento foi obtido por PCR utilizando os oligonucleotídeos Ntrc 1 e Ntrc 4 (item 4.14.1) e utilizando-se como molde o plasmídeo pTH6+ que contem a região codificadora do gene *ntrC* de *A. brasilense* clonado no vetor pTZ18R (MACHADO, 1995). Cerca de 1µg do produto de PCR foi marcado com [α 32 P]dCTP usando o sistema Megaprimer DNA Labelling (GE Healthcare) conforme recomendação do fabricante.

4.18.2 Preparo de membranas e hibridização

O DNA cromossomal das estirpes FP2, LHNTRC3 e LHNTRC5 foi digerido com *Pst*I e submetido à eletroforese em gel de agarose (0,7%) em tampão TAE. Os fragmentos de DNA foram transferidos por capilaridade para uma membrana Hybond N+ (GE Healthcare) seguindo instruções do fabricante. Antes da transferência, o gel foi tratado sucessivamente com a solução de depurinição (0,25M de HCl) por 10 minutos, com a solução de desnaturação (1,5M de NaCl e 0,5M de NaOH) por 30 minutos, com a solução de neutralização (1M de Tris e 1,5M de NaCl pH 7,5) por 20 minutos e, finalmente, com SSC 15X (solução estoque SSC 20X, NaCl 3M e citrato de sódio dihidratado 0,3M) por 10 minutos. Entre as etapas, o gel foi submetido a uma etapa de lavagem com água destilada esterilizada. A transferência para a membrana foi realizada durante a noite e o DNA foi fixado às membranas por exposição à luz ultravioleta (312nm) por 5 minutos. As membranas foram pré-hibridizadas em tampão fosfato (NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 0,5M pH 8; SDS 5%) por 10 minutos à 60°C. Após este período, foi adicionado DNA de salmão sonificado e desnaturado (concentração final 400ng/mL) e a membrana foi incubada por mais 5 horas a 60°C. A sonda marcada (previamente desnaturada) foi adicionada na mesma solução, a hibridização foi realizada a 60°C durante a noite. As membranas foram lavadas uma vez em SSC 0,1X; SDS 0,1% a 60°C por 30

minutos e expostas por 2 dias a um filme de raio-X com placa intensificadora. Após revelação, o filme foi analisado.

4.19 Determinação da atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN e BURRIS, 1967). Células de *A. brasilense* foram ensaiadas para atividade de nitrogenase em meio NFbHP líquido ou semi-sólido.

A atividade de nitrogenase em meio semi-sólido foi realizada em frascos de 10mL tipo ampicilina contendo 4mL de meio acrescido de 0,5mM de glutamato. Como inóculo foi utilizado 10 a 40 μ L de uma cultura saturada previamente cultivada em meio NFbHP contendo 20mM de NH₄Cl como fonte de nitrogênio. Após 16 - 24 horas de crescimento a 30°C, os frascos foram vedados com rolhas de borracha (subba-seal) e então injetado acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa do frasco), a cultura foi incubada nas mesmas condições por 1 hora. Após este período foi coletada uma amostra de 0,5mL da fase gasosa para análise do etileno formado por cromatografia. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120°C e do detector em 200°C. O gás de arraste foi o nitrogênio. Para o cálculo do etileno formado foi utilizado um padrão de etileno fornecido pela White Martins S.A. A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno total formado por minuto por miligrama de proteína total na cultura.

4.20 Determinação do desligamento-religamento da nitrogenase

A inativação reversível da nitrogenase (switch-off/switch-on) foi determinada pelo método da redução do acetileno a etileno como descrito acima, em células cultivadas em meio NFbHP líquido. Duas escalas de volume foram utilizadas: 10mL ou 110mL. Em ambas as condições foram utilizadas como pré-inóculo células crescidas em meio NFbHP suplementado com cloreto de amônio 20mM até saturação (3 dias a 30°C sob agitação de 120rpm). A atividade específica da nitrogenase variou entre 7 e 25 nmol de etileno formado por minuto por mg de proteína para todas as estirpes testadas.

4.20.1 Escala de 10mL

Cerca de 50 a 200 μ L de pré-inóculo foram transferidos para 10mL de meio NFbHP contendo 1% de LB e 5mM de glutamato de sódio como fonte de nitrogênio (frascos de 60mL). As culturas foram incubadas a 30°C sob agitação de 120rpm em agitador de água. Após 18-24 horas os frascos foram vedados com rolhas tipo “subba-seal” e 5mL de acetileno foram injetados. A produção de etileno foi monitorada após 10, 20 e 30 minutos. O experimento de desligamento-religamento foi iniciado apenas para as culturas nas quais a atividade da nitrogenase se apresentava linear entre os pontos 10, 20 e 30 minutos. Para avaliar o desligamento da nitrogenase foi adicionado ao meio de cultura NH₄Cl 0,25 ou 1mM, concentração final. Amostras de 0,5mL da fase gasosa foram coletadas nos tempos determinados e analisadas por cromatografia gasosa. Os resultados foram apresentados como porcentagem da atividade inicial da nitrogenase. A concentração de proteínas nas culturas variou de 0.20mg/mL a 0.30mg/mL.

4.20.2 Escala de 110mL

Cerca de 2 a 6mL de pré-inóculo foram transferidos para 110mL de meio NFbHP contendo 1% de LB e 5mM de glutamato de sódio como fonte de nitrogênio (frascos de 250mL). As culturas foram incubadas a 30°C sob agitação de 120rpm. Após 24-30 horas os frascos foram vedados com rolhas tipo “subba-seal” e 20mL de acetileno foram injetados. A produção de etileno foi monitorada após 20 e 40 minutos. A concentração de proteínas nas culturas durante o ensaio de atividade da nitrogenase variou de 0,30mg/mL a 0,45mg/mL. O desligamento da nitrogenase foi monitorado em resposta a anaerobiose e a adição de diferentes concentrações de NH₄Cl conforme descrito em cada experimento. O desligamento em resposta a anaerobiose foi realizado mantendo-se a cultura estacionária por 10 minutos. Para a preparação de membranas e extratos protéicos 10mL da cultura foram separados nos tempos indicados e processados conforme descrito no item 4.21.

4.21 Preparação de membrana de *A. brasilense*

Dez mililitros de cultura, obtidos conforme descrito no item 4.20.2, foram separados nos tempos indicados em cada experimento e imediatamente resfriados em nitrogênio líquido por 10 segundos. As células foram coletadas por centrifugação a 5.000rpm por 5 minutos, ressuspensas em 1mL de tampão SP (NaCl 8.5g/L;

K₂HPO₄ 7g/L; KH₂PO₄ 3g/L; pH 7.2) e sonicadas com 5 pulsos de 15 segundos com intervalos de 15 segundos no sonicador MSE Soniprep 150 usando amplitude de 10 µm. O extrato celular foi centrifugado a 13.000rpm por 10 minutos a 4°C. Uma fração (100µL) do sobrenadante foi armazenada sendo denominada fração celular total (membrana + citoplasma). O restante do sobrenadante foi submetido a ultracentrifugação a 250.000g por 30 minutos 4°C na ultracentrifuga Beckman TL-100 (rotor TLA-120.2). Uma alíquota (100µL) da parte superior do sobrenadante foi armazenada, esta fração representa a fração citoplasmática do extrato. O precipitado foi lavado com 1mL de tampão SP, submetido à nova ultracentrifugação (sob as mesmas condições). O precipitado foi finalmente ressuspenso em 100µl de tampão SP, e constitui a fração de membrana dos extratos. A pureza da fração de membrana foi analisada por western-blot das frações usando anticorpo contra proteína citoplasmática NifH.

4.22 Construção de plasmídeos

4.22.1 Construção do plasmídeo pLHFP9NTRC

O plasmídeo pMA-tc 9.1, que contém o gene *ntrC* da estirpe FP9 de *A. brasilense* clonado no vetor pCR4Blunt-TOPO, foi digerido com a enzima *EcoRI* e ligado ao vetor pLAFR3.18 digerido com a mesma enzima. Os plasmídeos recombinantes obtidos foram analisados pelo padrão de restrição com as enzimas (*BglII*-*BamHI*) para a seleção dos plasmídeos que continham o gene *ntrC* da estirpe FP9 no sentido de transcrição do promotor *lacZ* do vetor pLAFR3.18. Um plasmídeo recombinante foi selecionado e denominado pLHFP9NTRC.

4.22.2 Construção dos plasmídeos pLHPETDRAT, pLHPETDRAG, pLHPETDRATG e pLHPETNIFH

As regiões codificadoras dos genes *draT*, *draG*, *draTG* e *nifH* de *A. brasilense* foram amplificadas por PCR utilizando oligonucleotídeos sintetizados quimicamente. As seqüências deste oligonucleotídeos, representadas abaixo, foram baseadas em seqüências depositadas no GenBank (acesso M87319 – ZHANG *et al.*, 1992). Para facilitar a clonagem dos produtos de PCR no vetor pET28a, foram inseridos sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* nos primers complementares a região 5', e sítios para a enzima *EcoRI* nos primers complementares a região 3'. As seqüências dos oligonucleotídeos usados estão indicadas a baixo:

*Bam*HI *Nde*I

DraT 5' 5' GATTTGGATCCCATATGGCGGACGGTTCGGCGA 3'

*Eco*RI

DraT 3' 5' GATCGGAATTCAGAGAAGCGACAC 3'

*Bam*HI *Nde*I

DraG 5' 5' GACAGGGATCCCATATGACTGACCATTCCATCC 3'

*Eco*RI

DraG 3' 5' TGGTCGAATTCACCCCTGCTTGAG 3'

*Bam*HI *Nde*I

NifH 5' 5' AGGAGGGATCCCATATGTCTTTGCGCCAGATTG 3'

*Eco*RI

NifH 3' novo 5' TGGGGAATTCAGTTATCAGGCCTTG 3'

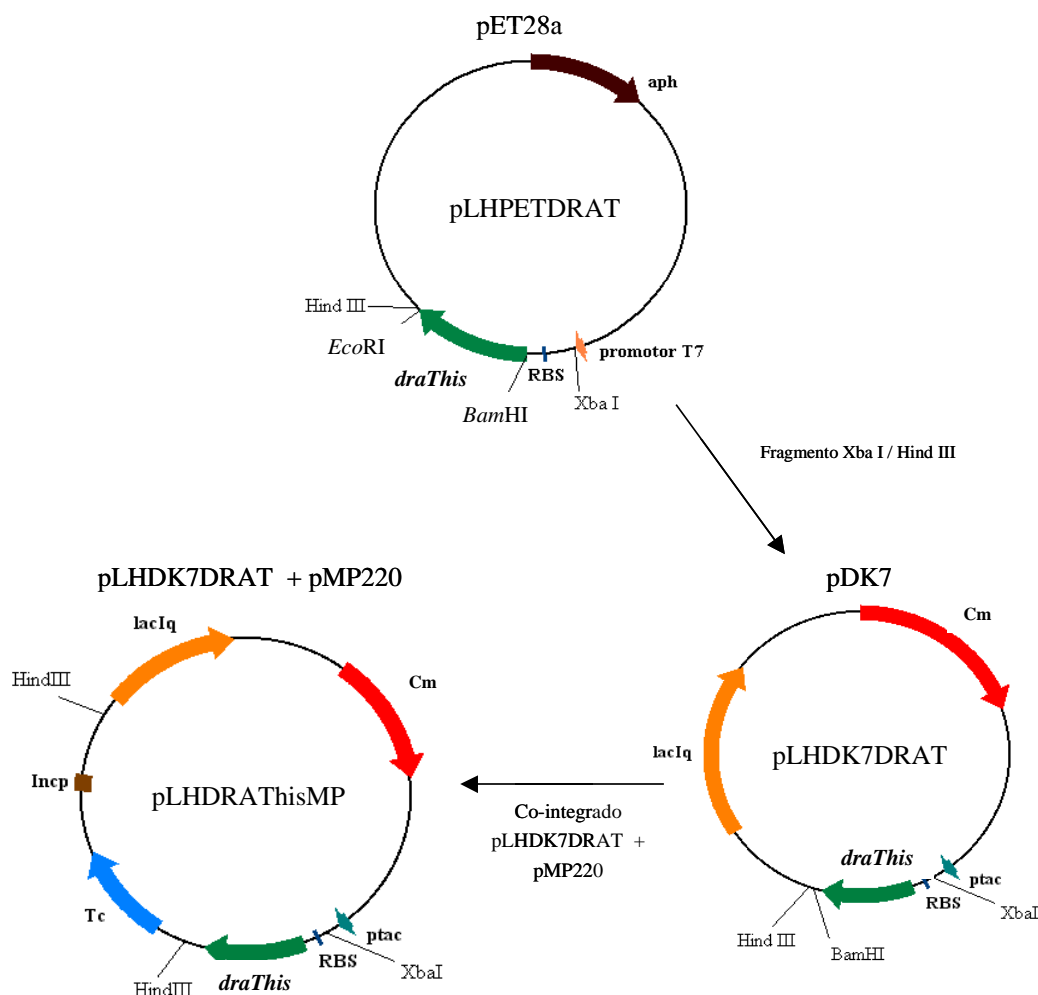
Como DNA molde para as reações de PCR foi utilizando 1 µL de uma cultura fervida de *A. brasilense* FP2 (cultura saturada diluída 10X em água e fervida por 10 minutos) em 25 µL de reação. Os ciclos de amplificação foram os seguintes: 1 ciclo de 96°C por 1 minuto; 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, 55°C por 20 segundos, 72°C por 2 minutos; 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. As reações de PCR produziram produtos únicos com o tamanho esperado os quais foram tratados com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), precipitados com etanol, secos em bomba de vácuo e ressuspensos em água. Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas *Eco*RI e *Bam*HI e ligados ao vetor pET28a digerido com as mesmas enzimas. Os plasmídeos recombinantes foram analisados por “Fast-preps” (item 4.12) e padrão de restrição. A seqüência de DNA dos plasmídeos obtidos foi confirmada por sequenciamento total dos insertos usando-se primers que flaqueiam o sitio de policlonagem do vetor pET28a e os seguintes primers: DraT interno Forward 5' CACCTTCGGGCTGAACCCGG 3', DraG interno Forward 5' GGCTGAAGGCGTTCCCGTC 3' e DraT interno2 5' CGATGCCGTCCCGCGCCAGC

3'. Os plasmídeos obtidos foram denominados pLHPETDRAT (gene *draT*), pLHPETDRAG (gene *draG*) e pLHPETDRATG (genes *draTG*). O plasmídeo pLHPETNIFH (gene *nifH*) foi parcialmente sequenciado com os iniciadores NifH descritos anteriormente.

4.22.3 Construção dos plasmídeos pLHDRAThisMP, pLHDRAGhisMP e pLHDRAThisGMP

Os plasmídeos pLHPETDRAT, pLHPETDRAG e pLHPETDRATG foram digeridos com as enzimas *Xba*I e *Hind*III, os fragmentos obtidos foram clonados no vetor pDK7 previamente digerido com as mesmas enzimas, originando os plasmídeos pLHDK7DRAT, pLHDK7DRAG e pLHDK7DRATG respectivamente (Figura 12). Estes plasmídeos expressam as proteínas His-DraT, His-DraG ou His-DraT e DraG sob controle do sítio de ligação de ribossomo (RBS) do plasmídeo pET28a (exceto DraG no plasmídeo pLHDK7DRATG que é expressa a partir de seu próprio RBS) e sob controle transcricional do promotor *ptac* regulado pelos níveis de IPTG. Os plasmídeos pLHDK7DRAT, pLHDK7DRAG e pLHDK7DRATG foram co-integrados com o plasmídeo pMP220, utilizando o sítio *Hind*III, dando origem aos plasmídeos pLHDRAThisMP, pLHDRAGhisMP e pLHDRAThisGMP (Figura 12). Estes plasmídeos são capazes de expressar as proteínas His-DraT, His-DraG ou His-DraT e DraG, em *A. brasilense* sujeito à regulação pelos níveis de IPTG no meio.

Figura 12 – Esquema da construção do plasmídeo pLHDRAThisMP.



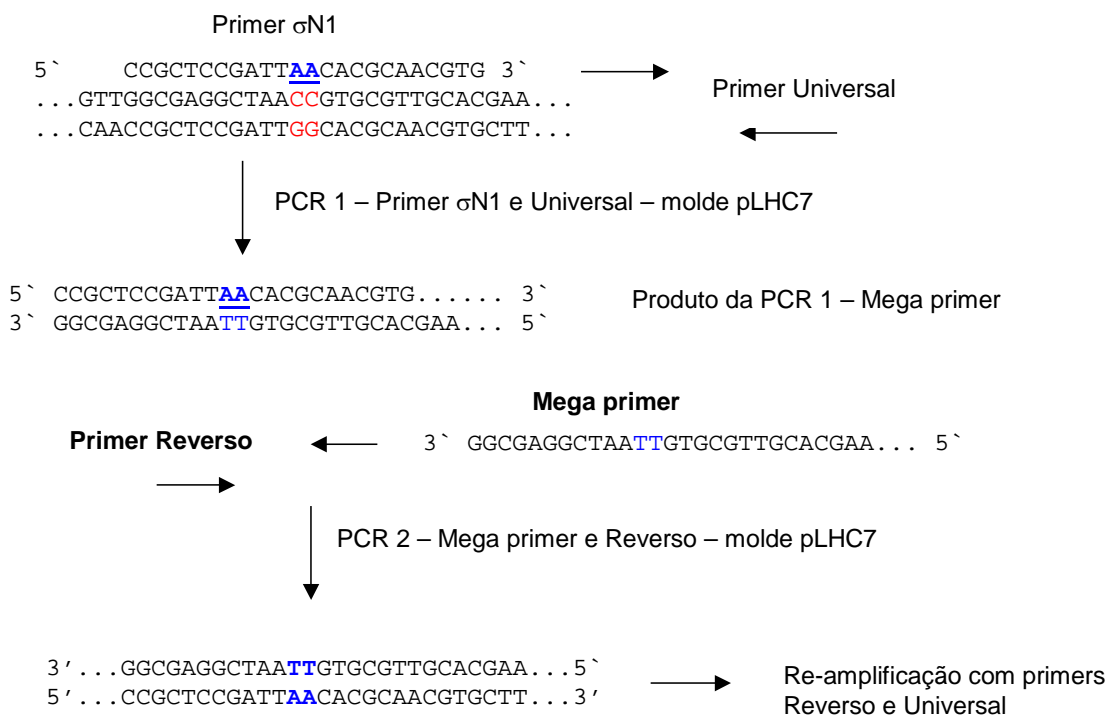
Um fragmento *Xba*I / *Hind*III, contendo a região codificadora para o gene *draT* do plasmídeo pLHPETDRAT, foi ligado ao vetor pDK7 digerido com as mesmas enzimas gerando o plasmídeo pLHDK7DRAT. Os plasmídeos pLHDK7DRAT e pMP220 foram co-integrados através do sítio *Hind*III gerando o plasmídeo pLHdraThisMP. Os mesmos passos de clonagem foram utilizados para obtenção dos plasmídeos pLHdraGhisMP e pLHdraThisGMP.

4.23 Mutagênese do promotor *glnBp2*

A mutagênese do promotor *glnBp2* foi realizada utilizando a técnica de PCR megaprimer descrita por CORMACK (1992). Um esquema da obtenção do promotor *glnB* com o sítio *glnBp2* mutagenizado está mostrado na Figura 13. Em uma primeira reação de PCR foi utilizado como DNA molde o plasmídeo pLHC7 (pTZ19R. *glnBp* - 285/+268, HUERGO, 2002) e como iniciadores o primer Universal, que é complementar ao vetor pTZ19R, e o primer mutagênico *glnB*σN1 (5'

CCGCTCCGATTAACACGCAACGTG 3') complementar ao sítio *glnBp2* porém com os nucleotídeos GG (região -24 do promotor *glnBp2*) trocados por AA. O produto obtido nesta primeira reação foi purificado em gel de agarose de baixo ponto de fusão (com o kit CONCERT™ da Life-Technologies). Este produto de PCR foi utilizado como iniciador em uma segunda reação de PCR juntamente com o primer Reverso (que é complementar ao pTZ19R), como molde desta reação novamente foi utilizando o plasmídeo pLHC7. O produto obtido foi purificado em gel de agarose de baixo ponto de fusão e re-amplificado em uma terceira PCR utilizando os iniciadores reverso e universal. O DNA amplificado da terceira reação foi digerido com as enzimas *SphI* e *BamHI* e clonado no vetor pTZ19R dando origem ao plasmídeo pLHglnBσN. A mutação do sítio *glnBp2* foi confirmada por sequenciamento. O fragmento contendo a região promotora mutagenizada foi subclonado como fragmento *SphI/BamHI* no vetor pPW452 dando origem ao plasmídeo pLHWglnBσN.

Figura 13 – Estratégia utilizada para mutação no sítio *glnBp2* na região promotora do gene *glnB* de *A. brasilense*.



As bases em vermelho indicam a região -24 do sítio *glnBp2*. As bases em azul indicam as alterações de base que foram alteradas na sequência original.

4.24 Obtenção da estirpe *A. brasilense* LFH3 (mutante *glnB* não polar)

A estirpe LFH3 contendo a mutação em *glnB* foi obtida usando o sistema λ -Red como descrito (GUST *et al.*, 2003), um protocolo detalhado esta disponível em http://streptomyces.org.uk/redirect/protocol_V1.3.pdf. O fragmento de 5,3kb *EcoRI/PstI* contendo a região codificadora do gene *glnB* do plasmídeo pAB448 foi ligado ao plasmídeo pTZ19R digerido com as mesmas enzimas gerando o plasmídeo pLFH7 (Figura 14). Este plasmídeo foi transferido para a estirpe de *E. coli* BW25113 contendo o plasmídeo pIJ790 o qual expressa as proteínas λ -Red. O gene *glnB* do plasmídeo pLFH7 foi substituído por um cassete de resistência a apramicina (Apra^R) usando “PCR targeting” (Figura 14). Os iniciadores usados na reação de PCR foram: GlnB apraF

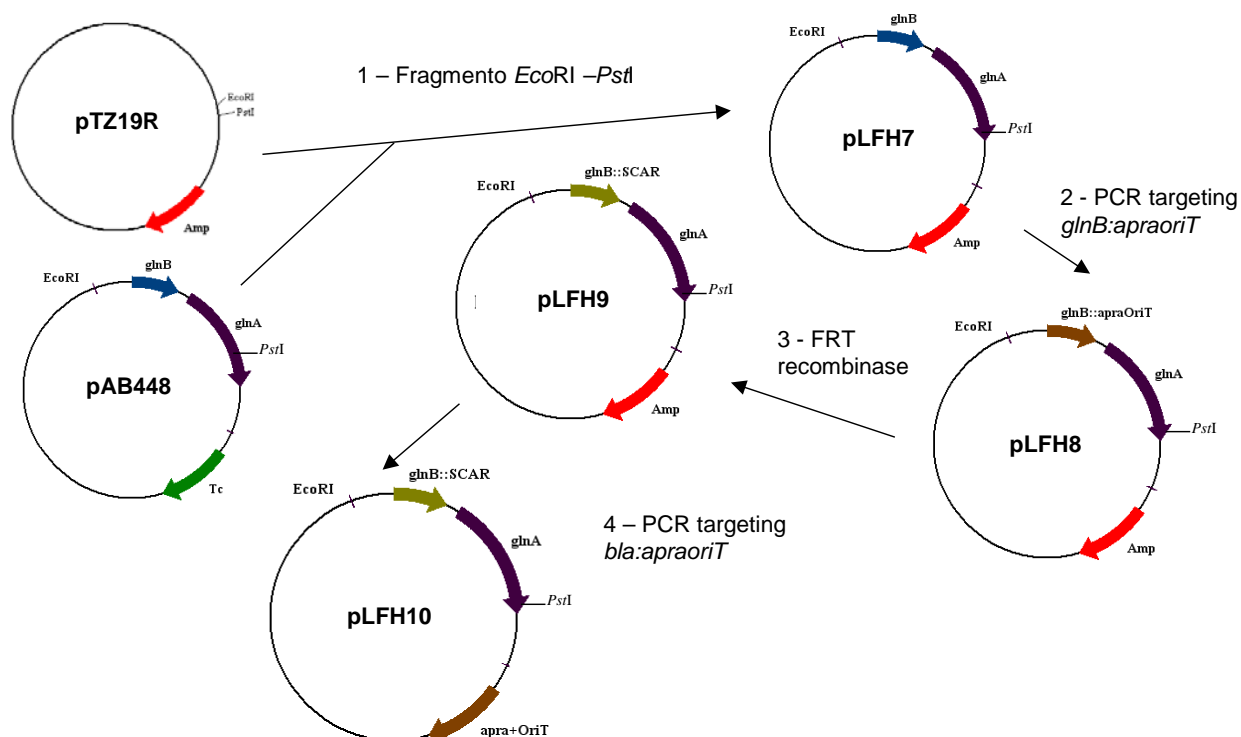
5'**GCCTGCCGACGTTGGCACCTCGTACACGAGAGACCCATG**ATTCCGGGGATC
 CGTCGACC 3' e GlnB apra^R
 5'**TTCATGGTGGCCGGTGGTCTCGGGACGCGATCA**TGTAGGCTGGAG
 CTGCTTC 3'. A região 5' marcada em negrito nos iniciadores se alinha com a região que flanqueia o gene *glnB* incluindo os códons de início e término de tradução sublinhados. A região 3' dos iniciadores se alinha com o cassete de resistência a apramicina. Estes iniciadores foram utilizados para amplificar o cassete Apra^R do plasmídeo pIJ773 por PCR, o produto de PCR foi utilizado para transformar, por eletroporação, células de *E. coli* BW25113 contendo os plasmídeos pLFH7 e pIJ790. As células foram plaqueadas em meio contendo carbenicilina (resistência do plasmídeo pLFH7) e apramicina (resistência do cassete) com a finalidade de selecionar células nas quais o gene *glnB* no plasmídeos pLFH7 foi trocado pelo cassete de apramicina. A troca do gene *glnB* pelo cassete Apra foi verificada por PCR utilizando iniciadores que flaqueiam o gene *glnB*: GlnB F2 5' CCCTATCCGTTGGCAGTCGC 3' e GlnB R2 5' CGTTATGTCATGCCTTTCCCAAGC 3', um plasmídeo foi selecionado e denominado pLFH8 (Figura 14).

Para a obtenção da versão “scar” do gene *glnB*, o plasmídeo pLFH8 foi transferido para *E. coli* DH10B contendo o plasmídeo pCP20 que codifica para a enzima FLP-recombinase (Figura 14), esta enzima remove a região central do cassete de apramicina deixando uma sequência de 81 pares de base gerando uma deleção “in-frame”. A correta excisão do cassete foi verificada por PCR e sequenciamento de DNA, um plasmídeo foi selecionado e denominado pLFH9. Uma versão mobilizável do plasmídeo pLFH9 foi obtida por “PCR-targeting” trocando-se o cassete de resistência a carbenicilina do plasmídeo pLFH9 por um cassete de apramicina contendo o sítio de mobilização *oriT*. Os iniciadores, bla forward 5' CCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG 3', bla reverse 5' AATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAG 3' foram utilizados para amplificar o cassete *apraoriT* usando o plasmídeo pIJ784 como molde. O produto de PCR foi transformado, por eletroporação, em células de *E. coli* BW25113 contendo os plasmídeos pLFH9 e pIJ790, células Cb^s e Apra^R foram selecionadas. A troca dos cassetes de resistência foi confirmada por análise de restrição, um plasmídeo foi selecionado e denominado pLFH10 (Figura 14).

O plasmídeo suicida pLFH10 foi transferido para a estirpe de *A. brasilense* 7628 (*glnB::km*) utilizando *E. coli* S17.1 como doadora. Simples recombinantes

foram selecionados em meio contendo Km e Apra, originado a estirpe LFH2 que é merodiplóide para *glnB*, contendo *glnB::km* e *glnB::scar*. A resolução da mutação (perda do cassete Km e do plasmídeos integrado) foi selecionada cultivando a estirpe LFH2 em meio não seletivo por varias gerações, as células foram plaqueadas em meio não seletivo para obtenção de colônias isoladas. Um total de 1.200 colônias foram analisadas, apenas 13 colônias apresentaram sensibilidade a Km e Apra, estas células foram analisadas para a perda do cassete de Km cassete e para a presença da versão “scar” do gene *glnB* por PCR usando primers que flanqueiam o gene *glnB* e um primers que se liga ao cassete Km, KmR 5' GGTGATGCGAGTGATTTTGATGACG 3'. As 13 colônias analisadas perteciam a 3 grupos genéticos distintos: A) 7 colônias perderam a versão “scar” do gene *glnB* e mantinham o cassete *km* no genoma; B) 5 colônias continham a versão “scar” do gene *glnB* e o cassete de *km*; C) Apenas 1 colônia apresentou o genótipo esperado, presença da versão “scar” do gene *glnB* e perda do cassete de canamicina. Esta colônia foi selecionada gerando a estirpe LFH3.

Figura 14 – Fluxograma da obtenção do plasmídeo pLFH10



Um fragmento *EcoRI* / *PstI* contendo a região codificadora do gene *glnB* e parte do gene *glnA* do plasmídeo pAB448 foi subclonado no vetor pTZ19R gerando o plasmídeo pLFH7. A região codificadora do gene *glnB* do plasmídeo pLFH7 foi substituída por um cassete *apraoriT* por “PCR-Targeting” gerando o plasmídeo pLFH8. O cassete *apraoriT* do plasmídeo pLFH8 foi removido por ação da enzima FRT recombinase gerando uma versão “scar” de *glnB* no plasmídeo pLFH9. O cassete de resistência a carbenilina do plasmídeo pLFH9 foi substituído por um cassete *apraoriT* por “PCR-Targeting” gerando o plasmídeo pLFH10.

4.25 Eletroforese de proteínas

4.25.1 Eletroforese sob condições desnaturante (SDS-PAGE)

Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes foram realizadas em gel de poliácridamida como descrito por LAEMMLI (1970). A concentração do gel de corrida variou de acordo com a massa molecular da proteína a ser analisada. As soluções estoque utilizadas estão descritas na tabela abaixo:

Tabela 2 – Soluções para eletroforese desnaturante

Acrilamida	30% Acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1)	Armazenada a 4°C
Solução 2	1,5M Tris-HCl pH8,8; 0,3% SDS	Armazenada a 4°C
Solução 3	0,5M Tris-HCl pH6,8; 0,4% SDS	Armazenada a 4°C
10% PA	Persulfato de amônio 10% v/v em água	Armazenada a 4°C
Tampão de amostra	2% SDS 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 0,0625M Tris-HCl pH 6,8; 5% β-mercaptoetanol (adicionado no momento do uso)	Armazenada a 4°C
Tampão de corrida (10X)	30g Tris-base, 140g Glicina 10g SDS por litro	Armazenado a temperatura ambiente

Os volumes das soluções estoque utilizadas para preparar os géis de empilhamento estão descritas na tabela abaixo:

Tabela 3 – Soluções para preparo do gel de empilhamento

Solução	1 gel	2 géis
Acrilamida	0,375mL	0,75mL
Solução 3	0,625mL	1,25mL
H₂O	1,5mL	3,0mL
10% PA	25μL	50μL
TEMED	2,5μL	5μL

Os volumes das soluções estoque utilizadas para preparar os géis de separação estão descritas na tabela abaixo:

Tabela 4 – Volumes das soluções para preparo do gel de separação.

Componente	7,5% (1gel)	7,5% (2 géis)	10% (1 gel)	10% (2 géis)	12,5% (1gel)	12,5% (2 géis)	15% (1 gel)	15% (2 géis)
Acrilamida	1,25mL	2,5mL	1,63mL	3,25mL	2,05mL	4,1mL	2,5mL	5mL
Solução 2	1,25mL	2,5mL	1,25mL	2,5mL	1,25mL	2,5mL	1,25mL	2,5mL
H₂O	2,5mL	5,0mL	2,13mL	4,25mL	1,7mL	3,4mL	1,25mL	2,5mL
10% PA	50μL	100μL	50μL	100μL	50μL	100μL	50μL	100μL
TEMED	5μl	10μl	5μl	10μl	5μl	10μl	5μl	10μl

As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (Biorad). As corridas foram realizadas a 100-200V em tampão de corrida 1X por 1 a 2 horas. Após a corrida o gel foi corado com Coomassie Blue ou com prata, ou transferido para membranas (western blot) dependendo do ensaio.

4.25.2 Eletroforese sob condições nativas (Native-PAGE)

Eletroforese de proteínas sob condições nativas foram realizadas utilizando o sistema descrito acima com as seguintes modificações:

- 1- Os tampões de corrida, solução 2, solução 3 e tampão de amostra foram preparados sem a adição de SDS e β -mercaptoetanol.
- 2- O tampão de amostra foi preparado no momento do uso.
- 3- O gel foi pré-corrido por 30 minutos a 60V a 4°C, sendo as amostras aplicadas (sem serem pré-aquecidas) e separadas a 60V a 4°C por cerca de duas a três horas.

4.26 Western Blot

Para as amostras convencionais 5 μ g de proteína total por linha foram separadas em géis de poliacrilamida (PAGE) desnaturante ou nativo e transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond ECL – GE Healthcare) utilizando um sistema de transferência semi-seco.

4.26.1 Preparação de amostras para analisar a modificação da proteína NifH e GS

Para se analisar a modificação pós-traducional das proteínas GS e NifH, 33 μ L da cultura de *A. brasilense* fixando nitrogênio (item 4.20.2) foram separados nos tempos indicados em cada experimento, misturados rapidamente com 17 μ L de tampão de amostra para eletroforese de proteínas 3X concentrado (item 4.25), a mistura foi congelada em nitrogênio líquido sendo então armazenada a -80°C. As amostras foram descongeladas por 1 minuto a temperatura ambiente, fervidas por 1 minuto, centrifugadas a 13.000rpm por 5 minutos, 6 μ L do sobrenadante foram aplicados em gel de proteína. A concentração dos géis de acrilamida foram de 7,5% para GS e 12,5% para NifH.

4.26.2 Tampões de transferência

Os tampões de transferência foram preparados a partir de duas soluções estoque: Tris 0,5M pH 10 e Ácido capróico 0,4M. Foram utilizados 3 tampões no processo de transferência de proteínas descritos na tabela abaixo:

Tabela 5 – Tampões de transferência

Anôdo 1 (A1)	Anôdo 2 (A2)	Catôdo (C)
150mL Tris	12,5mL Tris	12,5mL Tris
50mL metanol	50mL metanol	25mL ácido capróico
50mL H ₂ O	187,5mL H ₂ O	162,5mL H ₂ O
		50mL metanol

Os tampões foram armazenados a 4⁰C.

4.26.3 Transferência

A placa do anôdo foi inicialmente coberta com 4 camadas de papel filtro previamente imersas no tampão A1. Duas camadas de papel filtro contendo tampão A2 foram colocadas no sistema, seguido da membrana de nitrocelulose previamente imersa no tampão A2. O Gel foi então colocado sobre a membrana sempre se tomando o devido cuidado para evitar bolhas de ar no sistema. 6 camadas de papel filtro contendo tampão C foram colocadas sobre o gel. Uma pipeta de vidro foi utilizada para comprimir o sistema de transferência e expelir eventuais bolhas de ar. A placa do catôdo foi colocada sobre as folhas de papel filtro, o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese a 80mA por 1 hora. A transferência foi avaliada utilizando um marcador de proteína pré-corado (New England Biolabs).

4.26.4 Tratamento da membrana

Todo o tratamento da membrana foi realizado em tampão TBST (Tris pH 7,6; 2,42g/L; NaCl 8g/L; tween 20 1mL/L). Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% em TBST por 1 hora a temperatura ambiente. A membrana foi lavada com TBST e colocada em um saco plástico selado contendo 5mL de solução com o anticorpo primário em leite 1% TBST, sendo mantida a 4⁰C durante a noite sob agitação.

O anticorpo primário foi utilizado nas diluições indicadas abaixo (Tabela 6). Extratos celulares totais foram adicionados a solução contendo o anticorpo primário, como descrito na Tabela 6, para bloquear ligações inespecíficas. Apesar da alta

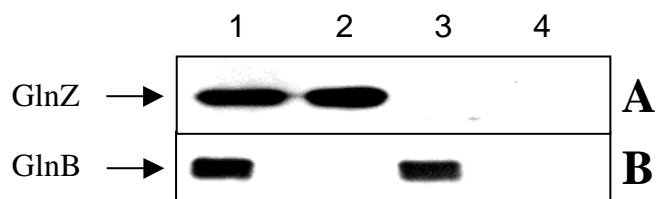
similaridade entre as proteínas GlnB e GlnZ (67% de identidade), os anticorpos anti-GlnB e anti-GlnZ não apresentaram reação cruzada com as proteínas GlnZ e GlnB respectivamente nas condições utilizadas neste trabalho como mostra o controle realizado (Figura 15).

Tabela 6 – Anticorpos e bloqueadores.

Anticorpo	Diluição	Agente bloqueador	Fonte do anticorpo
Anti-NifH	1/5.000	100µg/mL de extrato de células <i>A. brasilense</i> FP2 crescido em 40mM NH ₄ Cl	Este trabalho
Anti-DraT	1/2.500	100µg/mL de extrato de células <i>E. coli</i> FT8000	Este trabalho
Anti-DraG	1/2.500	100µg/mL de extrato de células <i>E. coli</i> FT8000	Este trabalho
Anti-GlnZ	1/1.000	100µg/mL de extrato de células <i>E. coli</i> FT8000	Mariana S. Araujo
Anti-GlnB	1/1.000	100µg/mL de extrato de células <i>E. coli</i> FT8000	Luiza M. Araújo
Anti-GS	1/10.000	nenhum	Wally Van Heeswijk

Após incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada por 15 minutos com TBST, seguido de 3 lavagens por 5 minutos. A membrana foi incubada com 10mL de solução contendo o anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase – GE Healthcare) na diluição de 1/5.000 a temperatura ambiente por 1 hora. Após 6 etapas de lavagens com TBST (1X de 15 minutos e 5X de 5 minutos), a membrana foi submetida à etapa de revelação utilizando o sistema ECL (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Os sinais foram capturados em filmes de raio-X (BioMax – GE Healthcare) e revelados com auxílio de um revelador automático.

Figura 15 – Controle de reação cruzada para os anticorpos anti-GlnB e anti-GlnZ



Extratos celulares totais foram preparados de células crescidas em meio NFbHP glutamato, submetidos a SDS-PAGE seguido de western blot usando anticorpo anti-GlnZ (A) ou anti-GlnB (B). Linha 1, FP2 estirpe selvagem. Linha 2, estirpe 7628 (*glnB::km*). Linha 3, estirpe 7611 (*glnZ::Ω*). Linha 4, estirpe 2812 (*glnB::km glnZ::Ω*)

4.27 Expressão das proteínas DraT , DraG e NifH de *A. brasilense*

A expressão das proteínas DraT, DraG e NifH de *A. brasilense* foi realizada em células de *E. coli* BL21 (λ DE3) contendo os plasmídeos pLHPETDRAT, pLHPETDRAG ou pLHPETNIFH, estes plasmídeos expressam as proteínas DraT, DraG e NifH fusionadas com uma seqüência de aminoácidos contendo 6 histidinas localizadas na porção N-terminal das proteínas que serão denominadas His-DraT, His-DraG e His-NifH. Duzentos mililitros de meio LB foram inoculados na proporção de 1/100 com uma cultura crescida durante a noite. As células foram cultivadas a 37°C sob agitação até DO₆₀₀ de 0,5. Neste momento foi adicionado IPTG 0,5mM e a cultura foi incubada por 4 horas a 30°C sob agitação. A cultura foi centrifugada a 5.000rpm por 5 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 5mL de tampão de sonicação: para DraT (50mM Tris-HCl pH8; NaCl 100mM; Glicerol 10%; DTT 1mM; ADP 1mM; N-lauril-sarcosil 0,5%), para DraG (50mM Tris-HCl pH8; NaCl 100mM; Glicerol 10%; DTT 1mM; MnCl₂ 0,5mM), e para NifH (50mM Tris-HCl pH8, NaCl 100mM, Glicerol 10%, DTT 1mM). As células foram lisadas por sonicação por 6 ciclos de 20 segundos e 1 minuto de intervalo. Durante o procedimento o extrato celular foi mantido em banho de gelo. Após a lise celular o extrato foi centrifugado a 13.000rpm por 10 minutos a 4°C, as frações solúvel e insolúvel foram separadas, as proteínas foram analisadas por eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) como descrito por LAEMMLI (1970). Os géis foram corados com Coomassie Blue.

4.28 Purificação da proteína His-DraT de *A. brasilense*

A proteína DraT fusionada com uma sequência de 6 histidinas na porção N-terminal (His-DraT) foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna Hi-Trap-Chelating-Ni²⁺ (GE Healthcare) acoplada a uma bomba peristáltica. A coluna Hi-Trap foi carregada com NiCl₂ como descrito pelo fabricante. A coluna foi equilibrada com 5mL do tampão de sonicação para DraT (50mM Tris-HCl pH8; NaCl 100mM; Glicerol 10%; DTT 1mM; ADP 1mM; N-lauril-sarcosil 0,5%) em seguida, 5mL do extrato livre de células, preparado como descrito no item 4.22, foram aplicados na coluna. A coluna foi lavada com 10mL de TP1 (50mM Tris-HCl pH6,8; 0,5M NaCl; ADP 1mM; N-lauril-sarcosil 0,05%) e 10mL de TP2 (TP1 contendo 10mM de imidazol). A eluição da proteína His-DraT foi realizada um gradiente crescente de imidazol. Foram adicionados 5mL de TP3 (50mM Tris-HCl pH8; 0,1M NaCl; 50mM de imidazol; glicerol 10%; 0,5mM de DTT; ADP 1mM; N-lauril-sarcosil 0,05%), 5mL de TP4 (TP3 contendo 100mM de imidazol), 5mL de TP5 (TP3 contendo 300mM de imidazol), 5mL de TP6 (TP3 contendo 500mM de imidazol). Foram coletadas frações de 1mL, as frações foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE, as frações com maior grau de pureza foram agrupadas e estocadas em alíquotas a -70 °C.

4.29 Purificação da proteína His-DraG de *A. brasilense*

A proteína DraG fusionada com uma sequência de 6 histidinas na porção N-terminal (His-DraG) foi purificada de maneira semelhante à utilizada na purificação da proteína His-DraT. A coluna Hi-Trap foi carregada com NiCl₂ como descrito pelo fabricante. A coluna foi equilibrada com 5mL do tampão de sonicação para DraG (50mM Tris-HCl pH8; NaCl 100mM; Glicerol 10%; DTT 1mM; MnCl₂ 0,5mM) em seguida, 5mL do extrato livre de células, preparado como descrito no item 4.27, foram aplicados na coluna. A coluna foi lavada com 10mL de TP1 (50mM Tris-HCl pH6,8; 0,5M NaCl) e 10mL de TP2 (TP1 contendo 10mM de imidazol). A eluição da proteína His-DraG foi realizada um gradiente crescente de imidazol. Foram adicionados 5mL de TP3 (50mM Tris-HCl pH8; 0,1M NaCl; 50mM imidazol; glicerol 10%; 0,5mM DTT; MnCl₂ 0,5mM), 5mL de TP4 (TP3 contendo 100mM de imidazol), 5mL de TP5 (TP3 contendo imidazol 300mM), 5mL de TP6 (TP3 contendo 500mM de imidazol). Foram coletadas frações de 1mL, as frações foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE, as frações com maior grau de pureza foram agrupadas e estocadas em alíquotas a -70 °C.

4.30 Purificação da proteína His-NifH de *A. brasilense*

A proteína NifH fusionada com uma sequência de 6 histidinas na porção N-terminal (His-NifH) foi purificada em cromatografia de afinidade com uma coluna de 1mL Hi-Trap chelating carregada com NiCl_2 como descrito pelo fabricante. Após a centrifugação do lisado celular (item 4.27) a proteína NifH permaneceu completamente insolúvel, para a purificação desta proteína o precipitado obtido após a lise celular foi ressuspenso em 1mL de tampão de solubilização TS (50mM Tris-HCl pH8, DTT 1mM, Glicerol 10%, NaCl 100mM, uréia 5M). A coluna foi equilibrada com 5mL do tampão de solubilização, em seguida, a fração contendo a proteína NifH solubilizada foi aplicada na coluna. A coluna foi lavada com 10mL de TP1 (50mM Tris-HCl pH6,8; 0,5M NaCl, 5M uréia) e 10mL de TP2 (TP1 contendo 10mM de imidazol). A eluição da proteína His-NifH foi realizada um gradiente crescente de imidazol. Foram adicionados 5mL de TP3 (50mM Tris-HCl pH8; 0,1M NaCl; 50mM de imidazol; glicerol 10%; 0,5mM de DTT, 5M uréia), 5mL de TP4 (TP3 contendo 100mM de imidazol), 5mL de TP5 (TP3 contendo 300mM de imidazol), 5mL de TP6 (TP3 contendo 500mM de imidazol). Foram coletadas frações de 1mL, as frações foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE, as frações mais puras foram agrupadas e estocadas em alíquotas a -70°C .

4.31 Produção de anticorpos policlonais contra as proteínas DraT , DraG e NifH

Para a obtenção de anticorpos policlonais para as proteínas DraT, DraG e NifH de *A. brasilense* foram realizadas 3 imunizações a cada 14 dias em coelhos albinos raça Novazelândia. As imunizações consistiram na injeção subcutânea e intramuscular de 500 μg de proteína purificada acrescida de 1mL de adjuvante incompleto de Freud. Após a última imunização foram coletados cerca de 40mL de sangue, o soro foi separado por centrifugação e armazenado a -70°C . Os anticorpos foram analisados por western blot (BURNETTE, 1981).

4.32 Interações *in vivo* entre DraT e DraG com as proteínas P_{II} por ensaios de co-precipitação (“pull-down”)

Os experimentos de co-precipitação ou “pull-down” foram realizados da seguinte maneira: células controle e células expressando a proteína His-DraT (a partir do plasmídeo pLHdraThisGMP) ou His-DraG (a partir do plasmídeo

pLHdraGhisMP), foram cultivadas em condições de fixação de nitrogênio como descrito no item 4.20.2. Uma alíquota de 30 mL da cultura foi retirada antes ou 5 minutos depois da adição de NH_4Cl 200 μM ; as células foram imediatamente resfriadas em nitrogênio líquido e coletadas por centrifugação (5.000g por 5 minutos a 4°C). As células foram ressuspensas em 1 mL de tampão SP contendo 5 mM de imidazol e rompidas por sonicação, o extrato celular foi clarificado por centrifugação (16.000g por 10 minutos a 4°C). As proteínas His-DraT e His-DraG foram parcialmente purificadas usando His MagTM Agarose Beads (Novagen) seguindo as instruções do fabricante. A concentração de imidazol foi de 15 mM no tampão de lavagem e 500 mM no tampão de eluição.

4.33 Atividade de β -galactosidase

A determinação da atividade de β -galactosidase foi realizada como descrito por MILLER (1992). A 100 μL das culturas foram acrescentados 900 μL de tampão Z (Na_2HPO_4 60mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40mM, KCl 10mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mM, β -mercaptoetanol 50mM e SDS 0,0027%) e 25 μL de clorofórmio. A mistura de reação foi incubada a 30°C por 5 minutos após agitação, e a reação iniciada pela adição de 200 μL de uma solução de o-nitro-fenilgalactopiranosídeo (ONPG) a 4mg/mL. Após a visualização da reação, esta foi interrompida com a adição de 500 μL de Na_2CO_3 1M. A atividade foi expressa em nmol de o-nitrofenol produzido por minuto por miligrama de proteína.

4.34 Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976) usando albumina de soro bovino como padrão. As determinações de proteínas em suspensões de células foram feitas após a lise alcalina em NaOH 0,5M e incubação por pelo menos uma hora a temperatura ambiente.

5. RESULTADOS

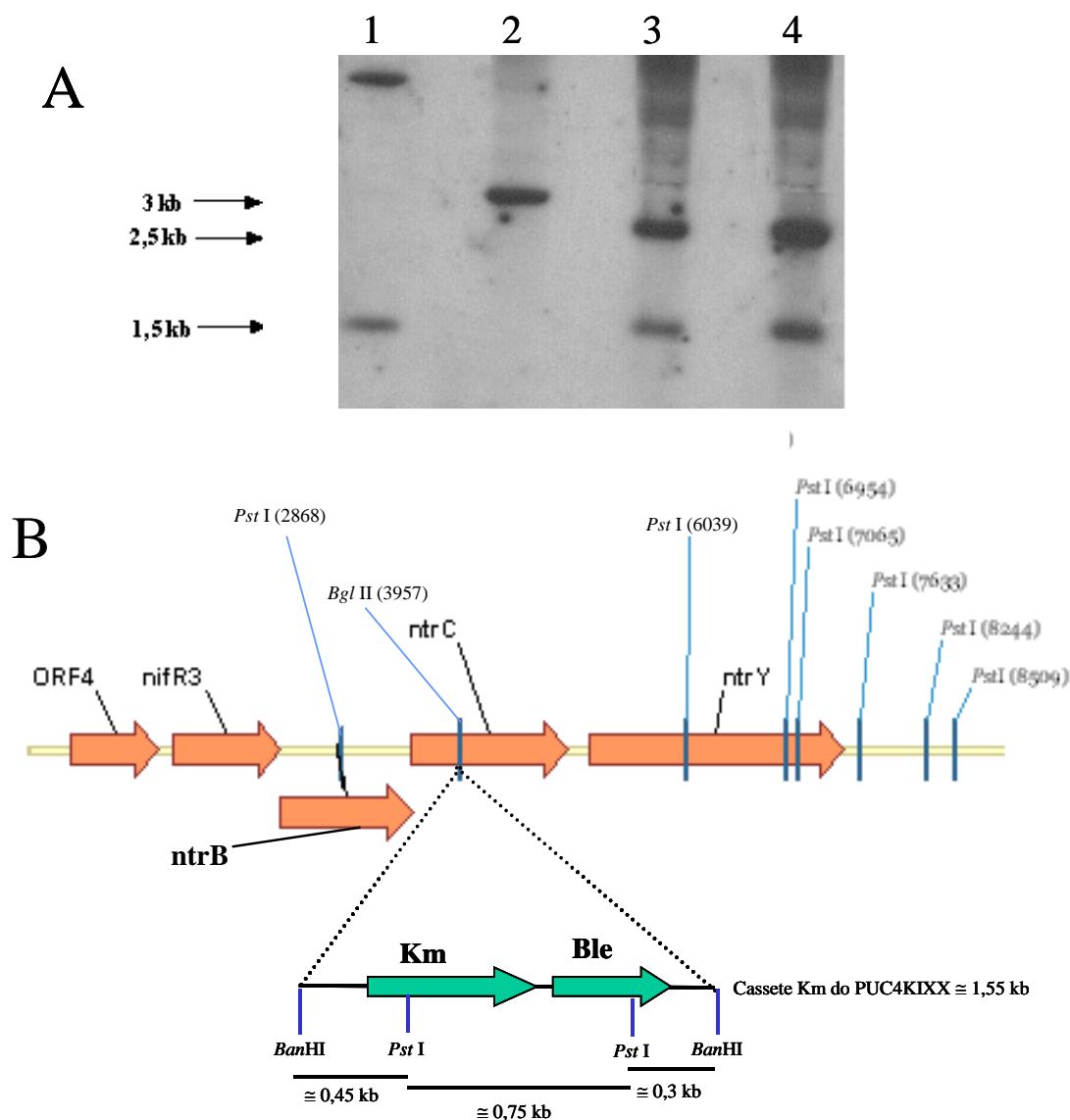
5.1 Papel da proteína NtrC no controle da expressão do operon *glnBA*

5.1.1 Obtenção de mutantes insercionais *ntrC::km* de *A. brasilense*

Com a finalidade de verificar se NtrC tem um papel na expressão do gene *glnB* em *A. brasilense*, foram obtidas estirpes mutantes *ntrC::km* (a obtenção destas estirpes está descrita em material e métodos). Duas colônias resistentes a canamicina 500µg/mL e sensíveis a cloranfenicol 30µg/mL, denominadas LHNTRC3 e LHNTRC5, foram escolhidas para caracterização genética e fisiológica. As estirpes LHNTRC3 e LHNTRC5 não foram capazes de crescer em meio NFbHP sólido contendo KNO₃ 20mM como fonte única de nitrogênio, este fenótipo é característico de mutantes *ntrC* (LIANG *et al.*, 1993; MACHADO *et al.*, 1995). Estas estirpes foram complementadas para crescimento em nitrato com o plasmídeo pLHC1 que expressa o gene *ntrC* de *A. brasilense* sob controle do promotor *lac* (MACHADO *et al.*, 1995) (dados não mostrados).

Para confirmar a correta inserção do cassete de canamicina no gene *ntrC* foram realizadas hibridizações de DNA utilizando como sonda o gene *ntrC* de *A. brasilense*. A partir do padrão diferenciado de hibridização do DNA cromossomal da estirpe selvagem e dos mutantes LHNTRC3 e LHNTRC5 pôde-se confirmar que a inserção do cassete de canamicina ocorreu no gene *ntrC* por um evento de recombinação dupla (Figura 16). Os mutantes LHNTRC3 e LHNTRC5 apresentaram o mesmo perfil de hibridização.

Figura 16 – Perfil de hibridização dos mutantes LHNTRC3 e LHNTRC5



A – Perfil de hibridização das estirpes FP2 (selvagem), LHNTRC3 e LHNTRC5 (mutantes *ntrC*) com a sonda *ntrC* de *A. brasilense*. Linha 1 – Plasmídeo controle pLHR3BCKm digerido com *Pst*I. Linha 2 – DNA cromossomal da estirpe selvagem FP2 digerido com *Pst*I. Linha 3 – DNA cromossomal da estirpe selvagem LHNTRC3 digerido com *Pst*I. Linha 4 – DNA cromossomal da estirpe selvagem LHNTRC5 digerido com *Pst*I. B – Mapa de restrição do gene *ntrC* de *A. brasilense*.

5.1.2 Atividade dos promotores *glnB* e *glnA* nos mutantes *ntrC::km*

Para avaliar o efeito da ausência da proteína NtrC na expressão dos genes *glnB* e *glnA*, os plasmídeos pLHWglnB, pLHMglnA, pAB904 e pAB912 foram introduzidos por conjugação nas estirpes FP2 (selvagem), LHNTRC3 (*ntrC*⁻) e LHNTRC5 (*ntrC*⁻). A expressão dos promotores foi avaliada através da determinação da atividade de β -galactosidase. Os resultados estão mostrados na tabela abaixo:

Tabela 7 – Expressão das fusões *glnB-lacZ* e *glnA-lacZ* em *A. brasilense*

Atividade do promotor - β -galactosidase (nmol o-nitrofenol/ (min . mg proteína)						
Estirpe	Plasmídeo					
	Condição	pAB904 (<i>glnB::lacZ</i>) traducional	pAB912 (<i>glnA::lacZ</i>) traducional	pLHWglnB (<i>glnB::lacZ</i>) transcricional	pLHMglnA (<i>glnA::lacZ</i>) transcricional	pW452 vetor transcricional
FP2 (Selvagem)	+NH ₄	2622 \pm 419	10118 \pm 1972	333 \pm 56	6497 \pm 745	365 \pm 44
	- NH ₄	24803 \pm 4034	3278 \pm 543	2499 \pm 315	3153 \pm 440	358 \pm 40
LHNTRC3 (<i>ntrC</i> ⁻)	+NH ₄	11106 \pm 2499	11946 \pm 1082	1458 \pm 278	6785 \pm 780	336 \pm 62
	- NH ₄	10488 \pm 1581	3039 \pm 585	1755 \pm 192	3126 \pm 384	279 \pm 48
LHNTRC5 (<i>ntrC</i> ⁻)	+NH ₄	13847 \pm 2480	13565 \pm 1494	1394 \pm 226	6584 \pm 861	290 \pm 62
	- NH ₄	11742 \pm 1958	2901 \pm 495	1665 \pm 200	3265 \pm 324	280 \pm 51

As células de *A. brasilense* contendo os diferentes plasmídeos foram crescidas em meio NFbHP contendo glutamato 0,5mM, na presença (+NH₄) ou ausência (-NH₄) de 20 mM NH₄Cl, a 30°C sob agitação (150rpm) por 15 horas e então ensaiadas para atividade de β -galactosidase. A atividade foi expressa como nmol de o-nitrofenol/ (minuto.mg de proteína). Os dados apresentados são média \pm desvio padrão de resultados obtidos com 3 transconjugantes diferentes testados em pelo menos três experimentos independentes.

Na estirpe selvagem FP2 a expressão do gene *glnB* foi induzida em resposta a limitação de nitrogênio (de 8 a 9 vezes). Por outro lado a expressão do gene *glnA* foi regulada de maneira oposta: sua expressão foi reduzida (de 2 a 3 vezes) em resposta a limitação de nitrogênio. Estes resultados estão de acordo com os observados por DE ZAMAROCZY e colaboradores (1993).

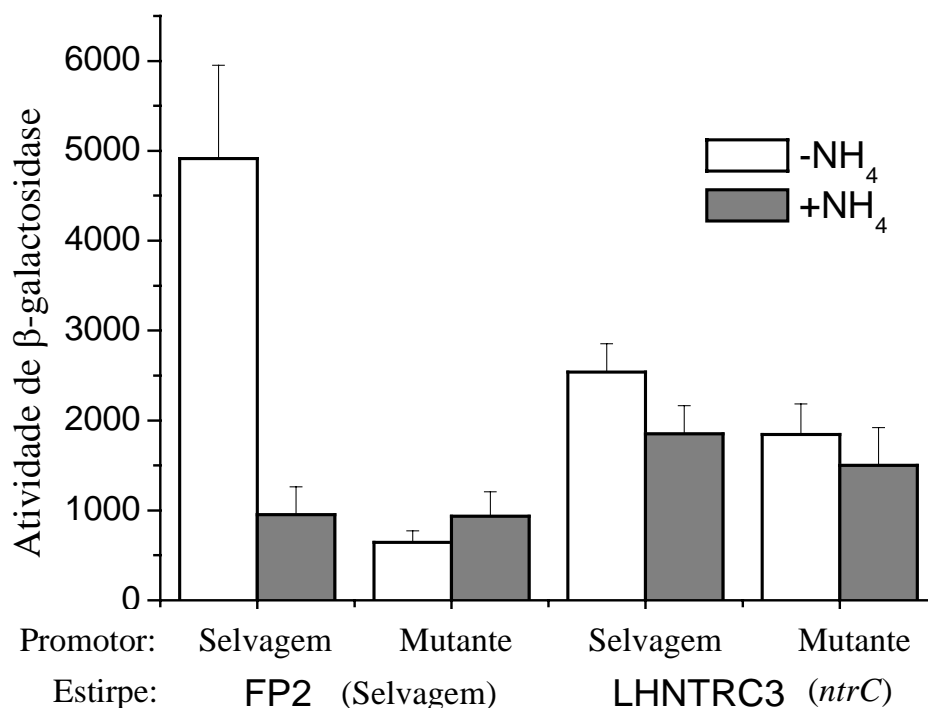
Entretanto, ao contrário do observado por DE ZAMAROCZY e colaboradores (1993), a expressão do gene *glnB* foi alterada nas estirpes mutante *ntrC* (LHNTRC3 e LHNTRC5) em relação à estirpe selvagem FP2 (Tabela 7). A atividade do promotor *glnB* nas estirpes *ntrC* permaneceu em um nível relativamente alto (metade da atividade observada na estirpe selvagem em limitação de nitrogênio) e perdeu a regulação pelos níveis de amônio. É provável que esta expressão seja dependente apenas do promotor σ^{70} - *glnBp1*. Este promotor se sobrepõe a dois possíveis sítios para ligação de NtrC (Figura 10), na ausência da proteína NtrC o sítio *glnBp1* estaria mais disponível para interagir com a σ^{70} -RNA polimerase aumentando assim sua atividade. A expressão do promotor *glnA* permaneceu inalterada nas estirpes *ntrC* (Tabela 7), indicando que a proteína NtrC não exerce papel na regulação da expressão de *glnA*, confirmando resultados anteriores (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993).

5.2 Efeito da mutação do promotor *glnBp2* na expressão de *glnB*

Para confirmar a hipótese de que a expressão de *glnB* observada nos mutantes *ntrC* ocorre apenas a partir do promotor tipo σ^{70} *glnBp1* foram construídos plasmídeos nos quais o promotor *glnBp2* foi mutagenizado. O promotor mutagenizado foi clonado a montante do gene *lacZ* sem promotor do vetor pPW452, dando origem ao plasmídeo recombinante pLHWglnB σ^N . Este plasmídeo foi inserido por conjugação nas estirpes FP2 e LHNTRC3, a expressão do gene *glnB* foi avaliada através da determinação da atividade de β -galactosidase (Figura 17).

Como esperado, *A. brasilense* FP2 contendo o plasmídeo pLHWglnB σ^N (promotor *glnBp2* – σ^N mutado) não foi capaz de induzir a expressão de *glnB* em limitação de nitrogênio (Figura 17). A expressão do gene *glnB* na estirpe LHNTRC3 (*ntrC*) contendo o plasmídeo pLHWC7 (promotor selvagem) foi muito similar à apresentada em células contendo o plasmídeo pLHWglnB σ^N (promotor *glnBp2* – σ^N mutado), porém maior do que a observada com o promotor mutado na estirpe selvagem FP2 (Figura 17). Estes resultados indicam que a expressão do gene *glnB* no mutante *ntrC* ocorre apenas pelo promotor *glnBp1*- σ^{70} que não é sensível à amônio, e também corrobora a hipótese de que a proteína NtrC regula negativamente a expressão do promotor *glnBp1*- σ^{70} .

Figura 17 – Efeito da mutação do promotor *glnBp2* (σ^N) sobre a expressão do gene *glnB*



Células de *A. brasilense* FP2 (selvagem) e LHNTRC3 (mutante *ntrC*) contendo o plasmídeo pLHWC7 (*glnBp1p2-lacZ*) ou o plasmídeo pLHWglnB σ^N (*glnBp1-lacZ* – promotor *glnBp2* mutado GG para AA na posição –24) foram cultivadas em meio NFbHP contendo glutamato 0,5mM, na presença (+NH₄) ou ausência (-NH₄) de 20 mM NH₄Cl, a 30°C sob agitação (150rpm) por 15 horas e então ensaiadas para atividade de β -galactosidase. A atividade é expressa como nmol de o-nitrofenol/ minuto . mg de proteína. Os dados apresentados são média \pm desvio padrão de resultados obtidos com 3 colônias transconjugantes diferentes testadas em pelo menos três experimentos independentes.

5.3 Determinação das bases moleculares para o fenótipo das estirpes FP8 e FP9 de *A. brasilense*

Os mutantes de *A. brasilense* FP8 e FP9 foram obtidos através de mutagênese química com nitrosoguanidina (PEDROSA e YATES, 1984). Estes mutantes apresentaram deficiência de crescimento em nitrato e incapacidade de fixar nitrogênio. Estes autores concluíram que a mutação nas estirpes FP8 e FP9 ocorrera no gene *ntrC*, uma vez que estes fenótipos foram complementados com o

gene *ntrC* de *K. pneumoniae*. Entretanto, mutantes *ntrC* insercionais obtidos por LIANG *et al* (1993) e MACHADO *et al.* (1995), apresentam um fenótipo parcial para a fixação de nitrogênio (de 50 a 80% da atividade da nitrogenase da estirpe selvagem). Posteriormente, DE ZAMAROCZY *et al.* (1993) e HUERGO (2002) verificaram que o fenótipo Nif⁻ do mutante FP9 é causado pela baixa expressão do gene *glnB* cujo produto é essencial para a fixação de nitrogênio em *A. brasilense*. Estes mesmos autores sugeriram que o mutante FP9 produziria uma forma mutante da proteína NtrC incapaz de ativar a transcrição de promotores tipo σ^N (*glnBp2*) porém, com alta afinidade por sítios NtrC-UAS levando ao bloqueio do promotor *glnBp1* do gene *glnB*, uma vez que este promotor se sobrepõe a dois prováveis sítios NtrC UAS (Figura 10).

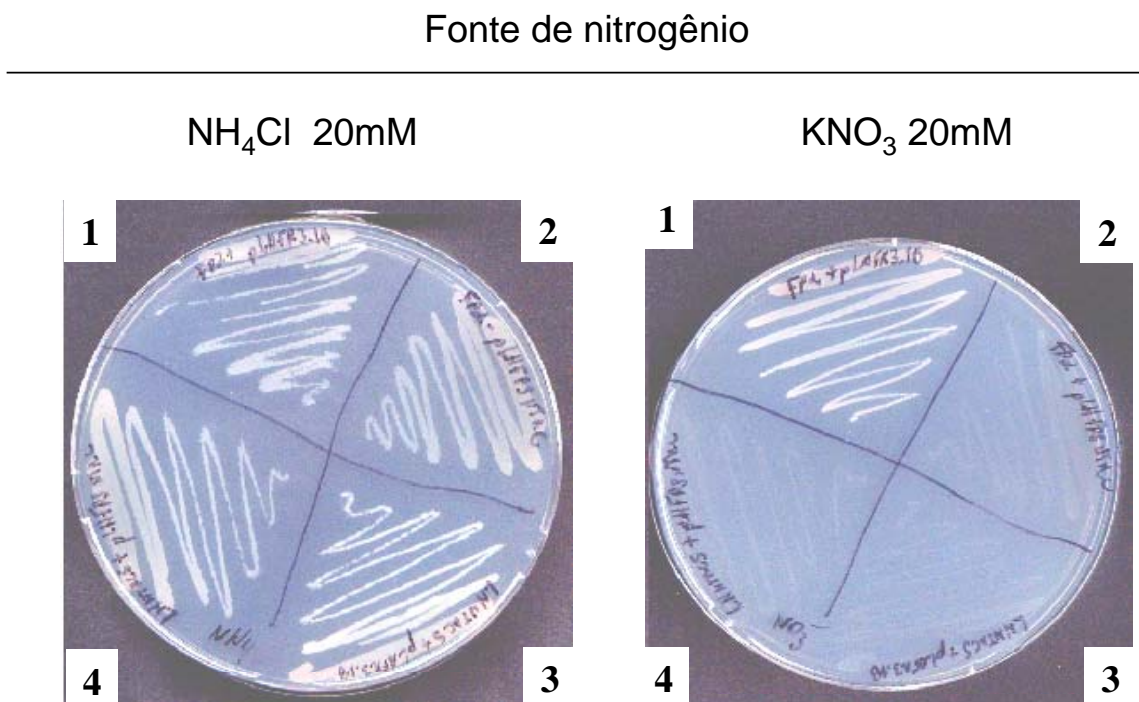
Para determinar se o fenótipo observado na estirpe FP9 é ocasionado especificamente por uma mutação no gene *ntrC* este gene foi isolado a partir do plasmídeo pMAc9.1 (ASSUMPÇÃO, 2002) e clonado no vetor pLAFR3.18 sob controle do promotor *plac*, originando o plasmídeo pLHFP9NTRC. Este plasmídeo foi inserido por conjugação nas estirpes FP2 e LHNTRC5 e as células transconjugantes foram testadas para crescimento nitrato e para atividade da nitrogenase.

5.3.1 Efeito da mutação do gene *ntrC* sobre a capacidade de crescimento em nitrato

Para determinar o efeito da expressão do gene *ntrC* da estirpe FP9 sobre a atividade da proteína NtrC selvagem, o plasmídeo pLHFP9NTRC (que expressa o gene *ntrC* da estirpe FP9) foi inserido nas estirpes FP2 (selvagem) e LHNTRC5 (*ntrC*⁻). Os transconjugantes foram testados quanto a capacidade de crescimento em meio NFbHP sólido contendo KNO₃ 20mM ou com NH₄Cl 20mM (Figura 18). Os transconjugantes não apresentaram deficiência de crescimento em meio contendo NH₄Cl 20mM como fonte de nitrogênio, entretanto, apenas a estirpe FP2 (pLAFR3.18) foi capaz de crescer em meio contendo KNO₃ 20mM como fonte única de nitrogênio, os demais transconjugantes não apresentaram crescimento em KNO₃. O plasmídeo expressando o gene *ntrC* da estirpe FP9 não complementou o crescimento em nitrato da estirpe LHNTRC5 (*ntrC*⁻) e a estirpe FP2 apresentou deficiência de crescimento em nitrato quando transformada com este plasmídeo. Estes resultados indicam que a proteína FP9-NtrC não é funcional e também que ela

apresenta um efeito dominante negativo sobre a proteína NtrC selvagem quando expressa a partir de um plasmídeo de baixo número de cópias.

Figura 18 – Efeito da expressão do gene *ntrC* da estirpe FP9 no crescimento em nitrato das estirpes FP2 (selvagem) e LHNTRC5 (*ntrC*)



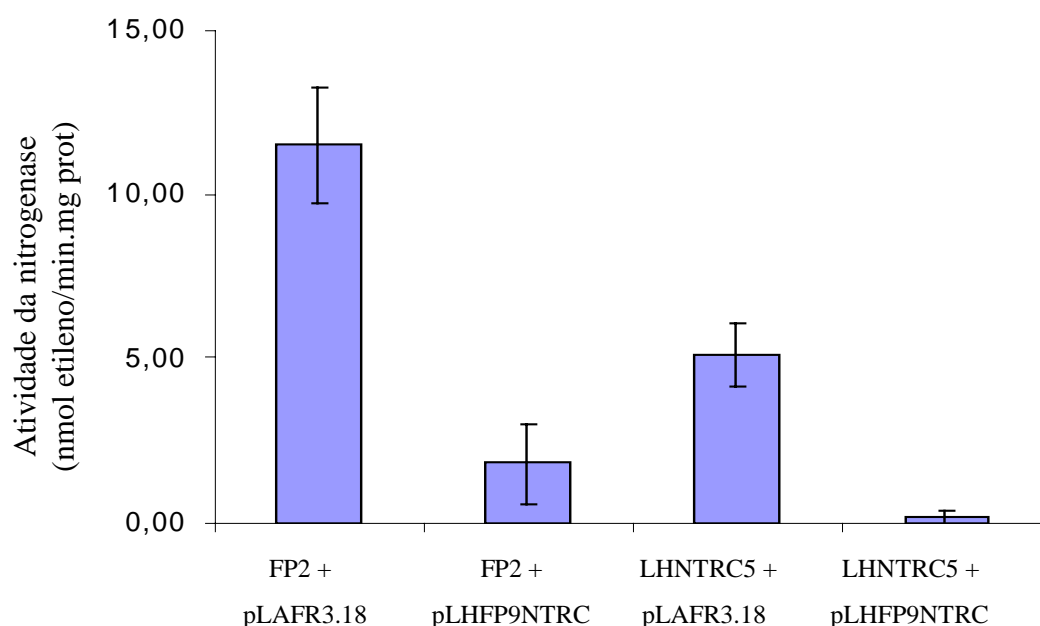
As células foram crescidas em meio NFbHPN líquido até a $\text{D.O}_{600} = 1$. Uma alíquota desta cultura foi plaqueada em meio sólido. As células foram incubadas a 30°C por 30 horas. Este experimento foi repetido duas vezes. 1- FP2 + pLAFR3.18 (vetor), 2- FP2 + pLHFP9NTRC (FP9-*ntrC*), 3- LHNTRC5 + pLAFR3.18 (vetor), 4- LHNTRC5 + pLHFP9NTRC (FP9-*ntrC*).

5.3.2 Efeito da mutação do gene *ntrC* sobre a atividade da nitrogenase

Para verificar o efeito da expressão do gene *ntrC* da estirpe FP9 sobre a atividade da nitrogenase o plasmídeo pLHFP9NTRC (que expressa o gene *ntrC* da estirpe FP9) foi inserido nas estirpes FP2 (selvagem) e LHNTRC5 (*ntrC*). Os transconjugantes foram ensaiados para atividade da nitrogenase em meio NFbHP semi-sólido e, como controle, as estirpes FP2 e LHNTRC5 receberam o vetor vazio pLAFR3.18 (Figura 19).

A expressão do gene FP9-*ntrC* causou uma redução de seis vezes na atividade da nitrogenase na estirpe selvagem FP2. No mutante insercional LHNTRC5 a atividade da nitrogenase foi 50% menor da observada na estirpe selvagem, confirmando dados anteriores (MACHADO *et al.*, 1995). Entretanto, a introdução do plasmídeo pLHFP9NTRC na estirpe LHNTRC5 ocasiona um fenótipo Nif muito similar ao observado na estirpe FP9, quase zero de atividade da nitrogenase (Figura 19). Este resultado sugere que o produto do gene *ntrC* da estirpe FP9 é a causa do fenótipo Nif negativo neste mutante. Os resultados de crescimento em nitrato e atividade da nitrogenase indicam que a proteína FP9-NtrC tem um efeito dominante negativo sobre a proteína NtrC selvagem quando expressa a partir do promotor *plac* no vetor de baixo número de cópias (pLHFP9NTRC), possivelmente devido a maior quantidade da proteína FP9-NtrC em relação à proteína selvagem nestas condições. O efeito oposto é observado pela introdução do gene *ntrC* selvagem na estirpe FP9 restaurando o crescimento em nitrato e atividade da nitrogenase (MACHADO *et al.*, 1995).

Figura 19 – Efeito da expressão do gene *ntrC* da estirpe FP9 sobre a atividade da nitrogenase nas estirpes FP2 (selvagem) e LHNTRC5 (*ntrC*)

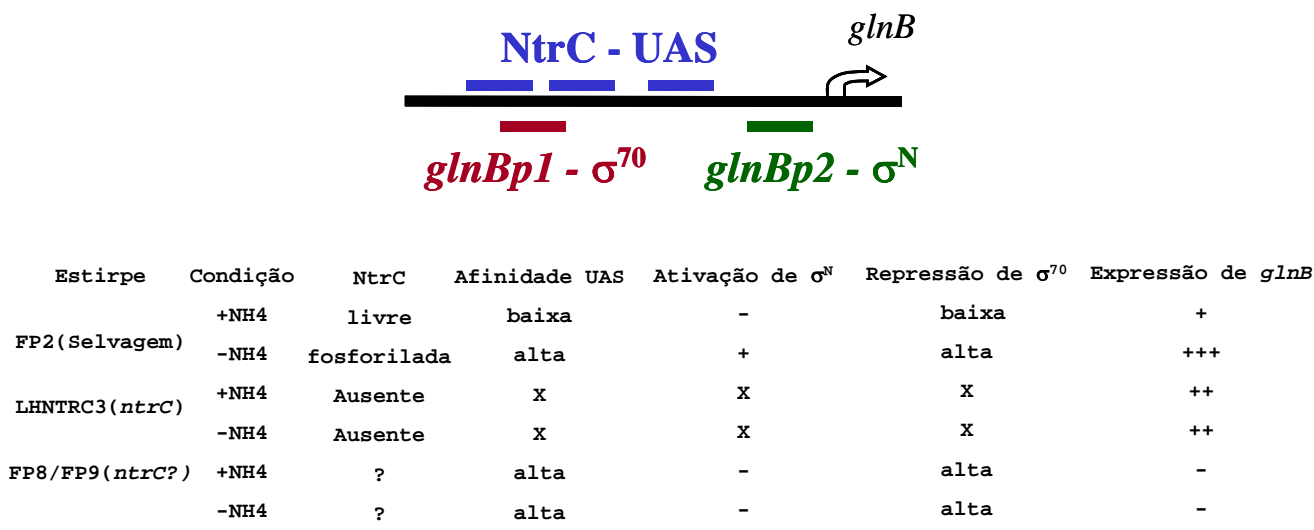


As células contendo o plasmídeo pLHFP9NTRC (expressa o gene *ntrC* da estirpe FP9) ou o plasmídeo controle pLAFR3.18 (vetor vazio) foram incubadas em meio NFbHP semi-sólido por 24 a 48 horas. A atividade da nitrogenase foi determinada como descrito em material e métodos. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 colônias transconjugantes diferentes ensaiadas em 3 experimentos independentes.

O gene *glnB* não é expresso na estirpe FP9 (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993), sugerindo que a redução da atividade da nitrogenase observada na presença da proteína FP9-NtrC (Figura 19) seja decorrente da baixa expressão de *glnB*. Estes dados corroboram a hipótese de que a proteína FP9-NtrC seria incapaz de ativar a transcrição do promotor *glnBp2* – σ^N , porém teria capacidade de se ligar a sítios NtrC-UAS no DNA bloqueando o promotor *glnBp1* – σ^{70} . Mutações na proteína NtrC que bloqueiam promotores σ^{70} e não são capazes de ativar promotores σ^N , foram descritas em *Salmonella typhimurium* e são conhecidas como formas repressoras

de NtrC ou NtrC(rep) (WEI e KUSTU, 1981; NORTH *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1999). Um modelo proposto para a regulação da expressão do gene *glnB* nas estirpes FP2 (selvagem), LHNTRC5 (*ntrC*) e FP9 (*ntrCRep*) está apresentado na Figura 20.

Figura 20 – Modelo para a regulação da atividade dos promotores do gene *glnB* de *A. brasilense* pela proteína NtrC



De acordo com o modelo proposto, a forma mutante da proteína NtrC produzida pela estirpe FP9 seria incapaz de ativar a transcrição do promotor *glnBp1* σ^N , porém teria alta afinidade por sítios NtrC UAS reprimindo portanto o promotor *glnBp1* σ^{70} devido a sobreposição dos sítios σ^{70} e NtrC UAS.

5.3.3 Efeito da mutação do gene *ntrC* sobre a expressão do operon *nifR3ntrBC*

A região promotora do operon *nifR3ntrBC* de *A. brasilense* apresenta similaridade ao promotor *glnBp1*: contém um possível promotor σ^{70} sobreposto a um possível sítio para NtrC, este promotor é regulado negativamente pela proteína NtrC (MACHADO *et al.*, 1995). Para determinar o efeito da proteína FP9-NtrC sobre a expressão do operon *nifR3ntrBC*, o plasmídeo pLHFP9NTRC foi inserido na estirpe HDK1 que contém uma fusão cromossomal *nifR3ntrBC-lacZ*. A atividade promotora foi avaliada nos transconjugantes através da determinação da atividade de β -galactosidase (Tabela 8).

Tabela 8 – Expressão da fusão cromossomal *nifR3ntrBC-lacZ* em *A. brasilense*

<i>A. brasilense</i>	Atividade de β -galactosidase (nmol o-nitrophenol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
	pLAFR3.18 (controle)		pLHFP9NTRC (<i>ntrC</i> -FP9)	
	+NH ₄	-NH ₄	+NH ₄	-NH ₄
HDK1 (<i>nifR3ntrBC-lacZ</i>)	804±37	2547±196	481±30	994±45

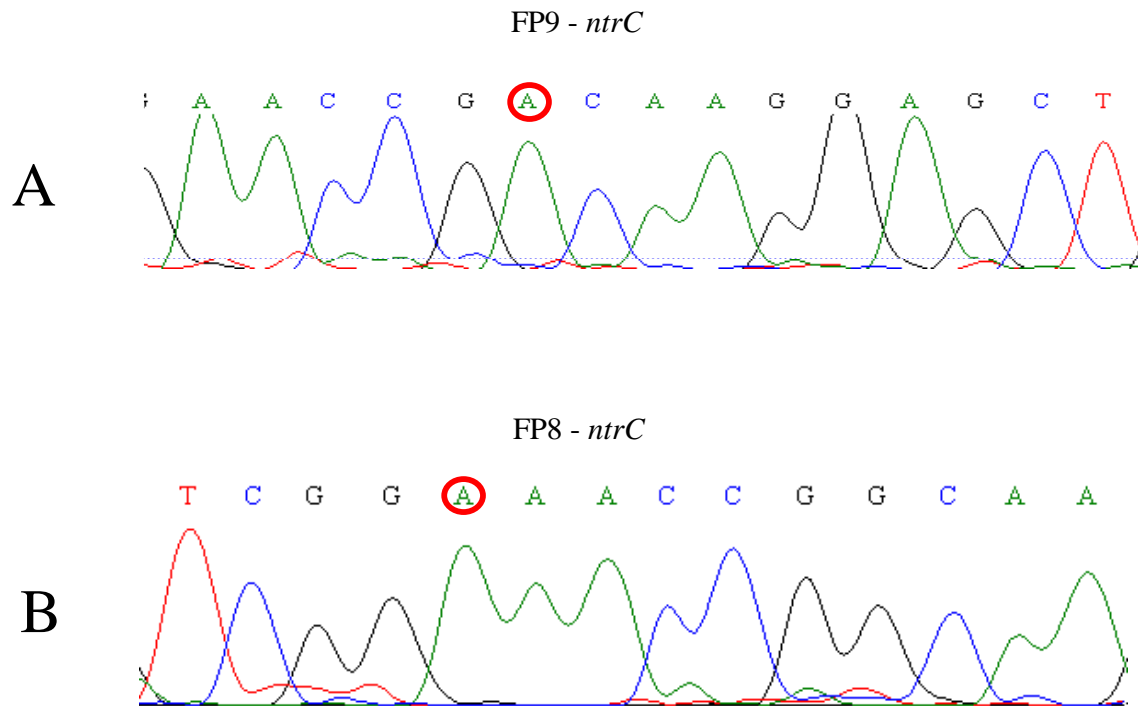
Os valores representam a média \pm desvio padrão de 3 colônias transconjugantes diferentes ensaiadas em duplicata em 3 experimentos independentes. -NH₄: condição de limitação de nitrogênio na presença de 0,5 mM glutamato. +NH₄: condição de excesso de nitrogênio na presença de 20 mM de cloreto de amônio e 0,5 mM glutamato.

A presença do plasmídeo pLHFP9NTRC causou redução da atividade do promotor em relação ao controle (HDK1 + vetor pLAFR3.18). Este resultado suporta a sugestão de que a proteína FP9-NtrC apresenta capacidade de se ligar a sítios UAS no DNA e reprimir o promotor σ^{70} do operon *nifR3ntrBC*.

5.3.4 Sequenciamento do gene *ntrC* das estirpes FP9 e FP8

Para identificar a mutação no gene *ntrC* da estirpe FP9 o DNA inserto do plasmídeo pLHFP9NTRC foi totalmente seqüenciado. A comparação da seqüência do gene FP9-*ntrC* (GenBank AY502106) com a seqüência do gene *ntrC* da estirpe FP2 (GenBank Z37984) indicou a presença de apenas uma troca de base na posição 520 da região codificadora do gene 520(G→A) (Figura 21A). Esta mutação leva a troca da glicina 240 na proteína NtrC por um aspartato, NtrC^{G240D}. O gene *ntrC* da estirpe FP8 também foi completamente seqüenciado (GenBank AY502105), a análise da seqüência indicou apenas uma troca de base na posição 514 da região codificadora do gene *ntrC* 514(G→A) (Figura 21B), esta mutação leva a troca da glicina 238 por um glutamato, NtrC^{G238E}. As mutações encontradas nas estirpes FP9 e FP8 levam a substituições das glicinas 238 e 240 do possível sítio para ligação de nucleotídeo da proteína NtrC também conhecido como motivo Walker A G₂₃₅E₂₃₆S₂₃₇G₂₃₈T₂₃₉G₂₄₀K₂₄₁E₂₄₂ (SARASTE *et al.*, 1990) (Figura 22).

Figura 21 – Eletroforetograma da região contendo as mutações encontradas no gene *ntrC* das estirpes FP9 e FP8 de *A. brasilense*



Os eletroforetogramas foram obtidos como descrito em material e métodos. As bases circuladas em vermelho indicam as trocas de base (G – A) observadas no gene FP9-*ntrC* (A) e FP8-*ntrC* (B) em relação à sequência do gene FP2-*ntrC* depositada no banco de dados (GenBank Z37984). Estas trocas de base foram observadas em 6 eletroforetogramas obtidos a partir de 6 reações distintas em ambas as fitas de DNA (fita codificadora e não codificadora).

Walker A

Walker B

Switch I

Walker B

91

As letras em azul indicam as mutações encontradas na proteína NtrC das estirpes FP8 e FP9 (G238E na proteína FP8-NtrC e G240D na proteína FP9-NtrC).

A troca da terceira glicina do motivo Walker A da proteína NtrC de *S. typhimurium* NtrC^{G173N} gera uma proteína com característica repressora NtrC(rep) (WEISS *et al.*, 1991). A proteína mutante não apresenta atividade ATPase e é incapaz de ligar ATP, apesar de manter sua capacidade de ligar-se ao DNA (WEISS *et al.*, 1991; NORTH *et al.*, 1996).

Em sua forma fosforilada NtrC é capaz de acoplar a energia liberada pela hidrólise do ATP para realizar a reação energeticamente desfavorável de isomerização de um complexo transcricional fechado para um complexo aberto. As formas mutantes da proteína NtrC de *A. brasilense* encontradas nas estirpes FP9 e FP8 (NtrC^{G240D} e NtrC^{G238E}) provavelmente são incapazes de ligar e hidrolisar ATP já que não apenas o tamanho mas também as cargas negativas dos novos resíduos devem contribuir para diminuir a afinidade por ATP. Como consequência, estas proteínas devem ser incapazes de formar um complexo transcricional aberto com a σ^N RNA polimerase holoenzima.

Os resultados apresentados nos itens anteriores sugerem que as formas mutantes da proteína NtrC de *A. brasilense* NtrC^{G240D} (FP9) e NtrC^{G238E} (FP8) mantêm sua capacidade de ligar ao DNA, porém são incapazes de ativar a transcrição a partir de promotores tipo σ^N . Estas características são típicas de formas repressoras da proteína NtrC e explicam os fenótipos Nif⁻ e Nar⁻ observados nas estirpes FP9 e FP8.

5.4 Purificação e produção de anticorpos policlonais para as proteínas His-DraT, His-DraG e His-NifH

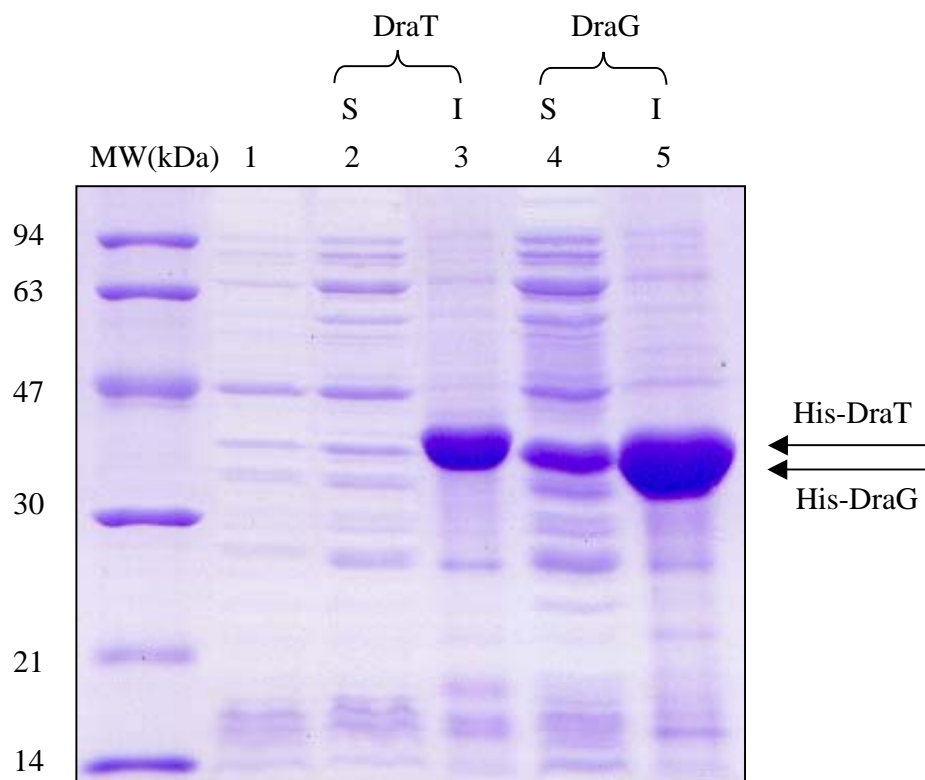
A atividade da nitrogenase em *A. brasilense* é regulada reversivelmente por ADP-ribosilação da proteína NifH. Em resposta a condições desfavoráveis para a fixação de nitrogênio as enzimas que modificam a proteína NifH (DraT e DraG) têm sua atividade regulada a nível pós-traducional, porém, os fatores envolvidos em tal regulação não são totalmente conhecidos. Para facilitar o estudo da regulação da atividade das enzimas DraT e DraG, foram obtidos anticorpos policlonais para estas proteínas. Os genes *draT*, *draG* e *nifH* de *A. brasilense* foram amplificados por PCR

e clonados no vetor de superexpressão pET28a. As proteínas DraT, DraG e NifH foram expressas em *E. coli* fusionadas com uma sequência de 6 resíduos de histidina na região N-terminal (His), e foram purificadas em cromatografia de afinidade. As proteínas purificadas foram utilizadas para obtenção dos anticorpos policlonais em coelhos.

5.4.1 Purificação da proteína His-DraT

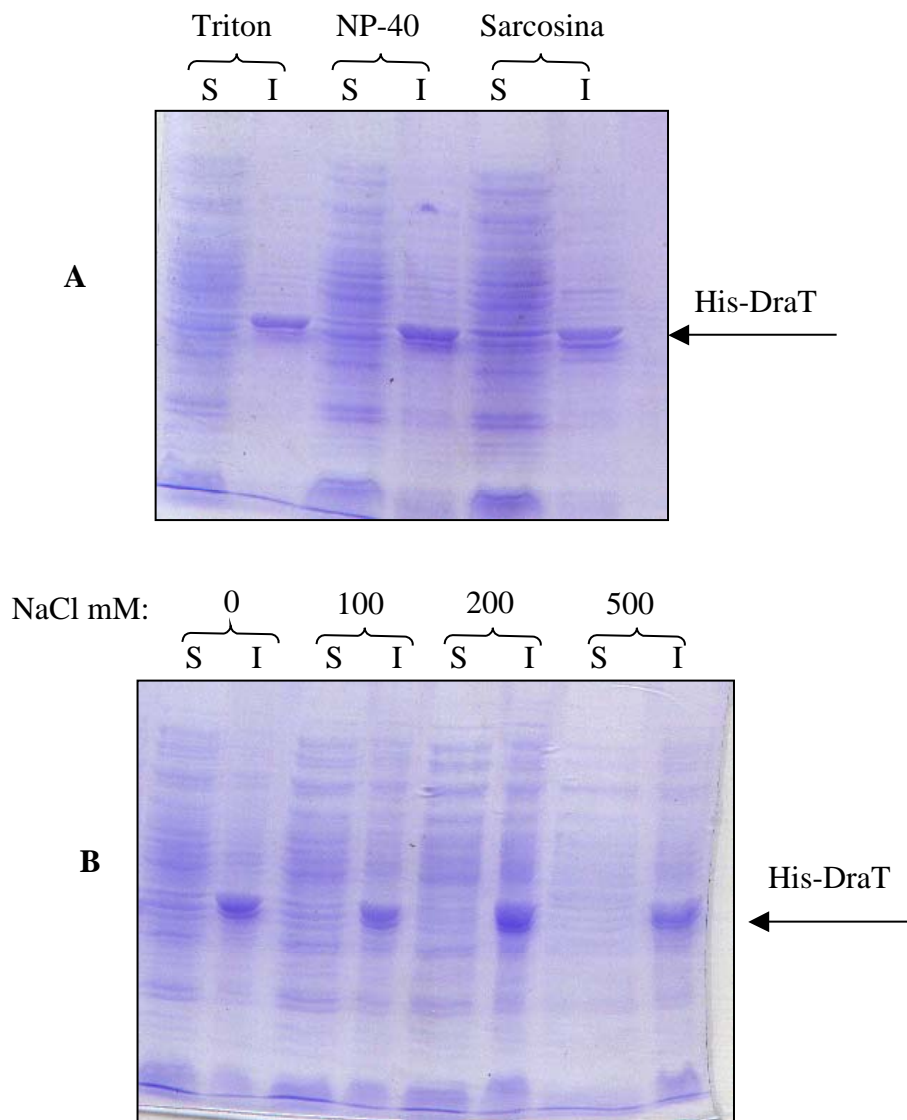
Células de *E. coli* BL21(λ DE3) *pLysS* foram transformadas com o plasmídeo pLHPETDRAT e induzidas com IPTG. As frações solúvel e insolúvel do extrato celular foram analisadas em géis SDS-PAGE 12%. A proteína His-DraT (banda de aproximadamente 35kDa) apresentou-se na fração insolúvel do extrato (Figura 23). Para tentar solubilizar a proteína His-DraT variou-se inicialmente a concentração de NaCl no tampão de sonicação. A variação na concentração de NaCl não ocasionou solubilização da proteína (Figura 24). Em nova tentativa de solubilização vários detergentes foram empregados. A presença de NP-40 ou Triton X100 0,1% no tampão de sonicação não alterou a solubilidade da proteína, entretanto a presença de N-lauril-sarcosil 0,1% proporcionou a solubilização parcial de His-DraT (Figura 24). Na presença de N-lauril-sarcosil 0,5% cerca de 50% da proteína His-DraT encontrava-se na fração solúvel do extrato (dados não mostrados). A solubilidade foi mantida após diálise em tampão sem N-lauril-sarcosil (dados não mostrados).

Figura 23 – Eletroforese dos extratos protéicos de *E. coli* BL21 (λ DE3) *plysS* expressando as proteínas His-DraT e His-DraG



Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% de proteínas do extrato de células *E. coli* BL21. Os marcadores de massa molecular estão indicados como MW em kDa. Linha 1 – extrato total de células contendo o plasmídeo pET28a. Linha 2 – Fração solúvel de células contendo o plasmídeo pLHPETDRAT. Linha 3 – Fração insolúvel de células contendo o plasmídeo pLHPETDRAT. Linha 4 – Fração solúvel de células contendo o plasmídeo pLHPETDRAG. Linha 5 – Fração insolúvel de células contendo o plasmídeo pLHPETDRAG. As setas indicam as proteínas His-DraT e His-DraG superexpressas. O gel foi corado com Coomassie Blue.

Figura 24 – Ensaio de solubilização da proteína His-DraT



Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% de proteínas presentes nas frações solúvel (S) e insolúvel (I) dos extratos de células *E. coli* BL21 expressando a proteína His-DraT. Gel A – Efeito da adição de detergentes ao tampão de sonicação sobre a solubilidade da proteína DraT. Foram adicionados os detergentes indicados ao tampão de sonicação na concentração final de 0,1%. Gel B – Efeito da concentração de NaCl (em mM) sobre a solubilidade da proteína DraT. As células foram induzidas com IPTG como descrito em material e métodos. As setas indicam a proteína His-DraT superexpressa. O gel foi corado com Coomassie Blue.

A proteína His-DraT solubilizada foi purificada em um único passo em cromatografia de afinidade HiTrap chelating (GE - Healthcare) carregada com cloreto de níquel. A proteína His-DraT foi eluída com 300mM de imidazol e analisada em gel SDS-PAGE (Figura 25), as amostras com maior grau de pureza foram agrupadas e estocadas em alíquotas a -70°C . Para avaliar o grau de pureza da proteína His-DraT uma amostra contendo $1\mu\text{g}$ da proteína foi submetida à eletroforese SDS-PAGE sendo o gel corado com prata (Figura 26). A análise densitométrica realizada (programa LabWorks – UVP) indicou uma pureza de 92%. Os dados da purificação estão mostrados no quadro abaixo:

Volume de cultura*	Fração mais concentrada	Total de proteína purificada ⁺	Pureza [#]
200mL	0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	350 μg	92%

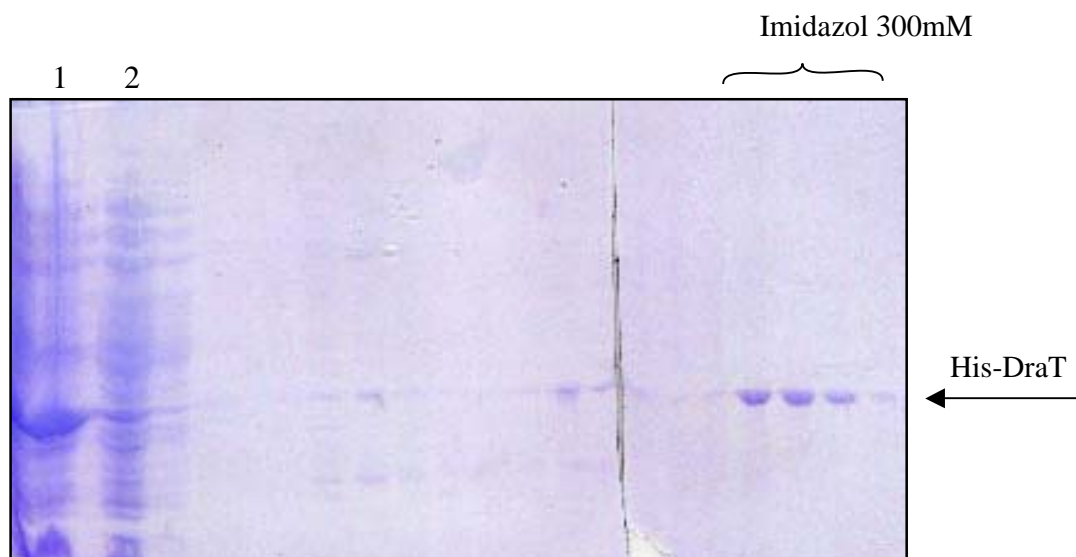
* Células de *E. coli* BL21(λ DE3) *pLysS* cultivadas em LB após indução com IPTG 0,5mM, aproximadamente 10^9 células por mL.

⁺ Soma das proteínas totais presentes nas frações consideradas purificadas após a cromatografia.

[#] Análise por densitometria de gel SDS-PAGE corado com prata contendo $1\mu\text{g}$ de proteína purificada.

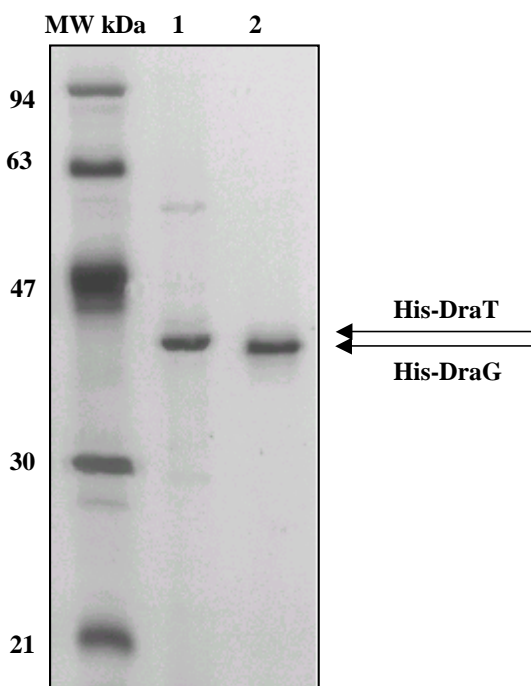
Os dados apresentados no quadro indicam que em um único passo cromatográfico a proteína His-DraT foi purificada atingindo-se 92% de homogeneidade. Em 1988, LOWERY e LUDDEN descreveram a purificação da proteína DraT de *R. rubrum*. Estes autores partiram de 1kg de células de *R. rubrum* para obtenção de $4\mu\text{g}$ de DraT com 40% de pureza em 4 passos cromatográficos. Os dados apresentados no quadro acima demonstram a eficiência da purificação descrita neste trabalho. A purificação da proteína DraT em apenas um passo cromatográfico pode resultar em uma maior quantidade de proteína ativa, já que LOWERY e LUDDEN (1988) observaram que a proteína DraT de *R. rubrum* apresenta uma baixa estabilidade com tempo de meia vida entre 10 a 18 horas.

Figura 25 – Perfil eletroforético de frações obtidas durante a purificação da proteína His-DraT



Eletroforese de alíquotas das frações eluídas da coluna Hi-trap chelating com gradiente de imidazol. Linha 1 – Extrato bruto aplicado na coluna. Linha 2 – Extrato bruto eluido da coluna. As frações eluídas com 300mM de imidazol estão indicadas. A seta indica a proteína His-DraT. As amostras foram analisadas em SDS-PAGE 12%. O gel foi corado com Coomassie Blue.

Figura 26 – Perfil eletroforético das frações contendo as proteínas His-DraT e His-DraG após a purificação



Eletroforese em SDS-PAGE 12% contendo 1µg das proteínas His-DraT e His-DraG purificadas. Os marcadores de massa molecular estão indicados como MW em kDa. Linha 1 - 1µg da proteína His-DraT. Linha 2 - 1µg da proteína His-DraG. O gel foi corado com prata.

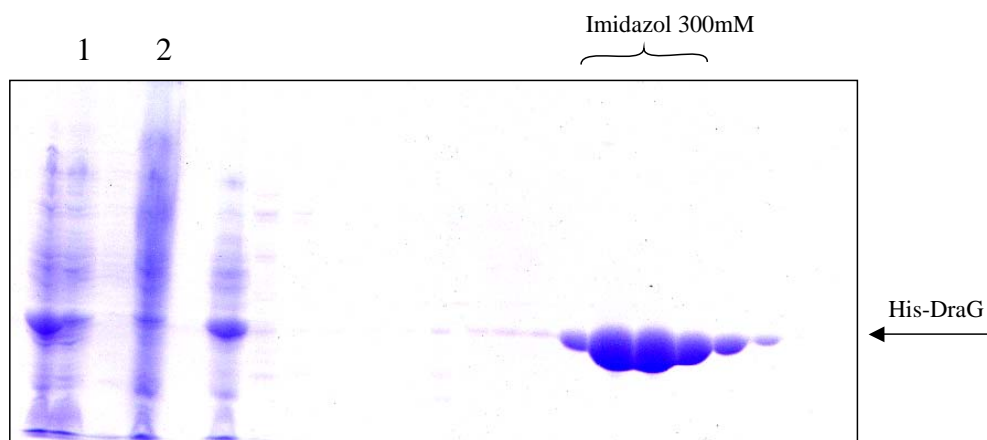
5.4.2 Purificação da proteína His-DraG

Células de *E. coli* BL21(λDE3) *pLysS* foram transformadas com o plasmídeo pLHPETDRAG e induzidas com IPTG. As frações solúvel e insolúvel do extrato celular foram analisadas em géis SDS-PAGE 12%. A proteína His-DraG (banda de aproximadamente 34kDa) apresenta-se quase totalmente na fração insolúvel (Figura 23). Estudos anteriores indicavam que a proteína DraG de *A. brasilense* e de *R. rubrum* permaneciam na fração de membrana das células e que a proteína pode ser solubilizada na presença de 0,5M de NaCl (LJUNGSTROM *et al.*; 1989; SAARI *et al.*; 1984). Para tentar aumentar a solubilidade da proteína His-DraG variou-se a concentração de NaCl no tampão de sonicação. Ao contrário do que foi observado em outros trabalhos a proteína His-DraG não teve sua solubilidade aumentada na presença de NaCl 0,5M (dados não mostrados). Em vista disso, o tampão escolhido

para a lise do extrato celular expressando a proteína His-DraG contém NaCl 0,1M (material e métodos), e as frações solúveis foram utilizadas na purificação.

A proteína His-DraG foi purificada em cromatografia de afinidade em coluna HiTrap chelating (GE - Healthcare) carregada com cloreto de níquel. A proteína His-DraG foi eluída com 300mM de imidazol e analisada em gel SDS-PAGE (Figura 27). As frações que continham a proteína His-DraG em alta concentração apresentaram precipitados após 10 minutos da eluição, as amostras precipitadas foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000rpm, a análise em eletroforese revelou que uma grande quantidade da proteína His-DraG permaneceu solúvel (dados não mostrados). As frações com maior grau de pureza, tanto solúveis quanto precipitadas, foram agrupadas e estocadas em alíquotas a -70°C .

Figura 27 – Perfil eletroforético de frações obtidas durante a purificação da proteína His-DraG



Eletroforese de alíquotas das frações eluídas da coluna Hi-trap chelating com gradiente de imidazol. Linha 1 – Extrato bruto aplicado na coluna. Linha 2 – Extrato bruto eluído da coluna. As frações eluídas com 300mM de imidazol estão indicadas. A seta indica a proteína His-DraG. As amostras foram analisadas em SDS-PAGE 12%. O gel foi corado com Coomassie Blue.

Para avaliar o grau de pureza da proteína His-DraG uma amostra contendo 1µg da proteína foi submetida à eletroforese SDS-PAGE sendo o gel corado com prata (Figura 26). A análise densitométrica realizada (programa LabWorks – UVP) indicou uma pureza de 99%. Os dados da purificação estão mostrados no quadro abaixo:

Volume de cultura*	Fração mais concentrada	Total de proteína purificada ⁺	Pureza [#]
200mL	1,93µg/µL	3,5mg	99%

* Células de *E. coli* BL21(λDE3) *pLysS* cultivadas em LB após indução com IPTG 0,5mM, aproximadamente 10⁹ células por mL.

⁺ Soma das proteínas totais presentes nas frações consideradas puras após a cromatografia.

[#] Análise por densitometria de gel SDS-PAGE corado com prata contendo 1µg de proteína purificada.

Em trabalhos anteriores já havia sido descrita a purificação das proteínas DraG de *R. rubrum* (SAARI *et al.*, 1984) e de *A. brasilense* (LJUNGSTROM *et al.*, 1989). A proteína DraG de *R. rubrum* foi purificada a partir de 1kg de células para obtenção de 77µg de DraG com 90% de pureza, em *A. brasilense* os autores partiram de 120g de células para obter 66µg de DraG com 95% de pureza, em ambos os trabalhos foram utilizados vários passos cromatográficos.

Os dados apresentados no quadro acima indicam que partindo de apenas 200mL de cultura em um único passo cromatográfico a proteína His-DraG foi purificada atingindo-se 99% de homogeneidade. As proteínas His-DraT e His-DraG purificadas poderão futuramente ser utilizadas para ensaios de *in vitro*.

5.4.3 Purificação da proteína His-NifH

Células de *E. coli* BL21(λDE3) *pLysS* foram transformadas com o plasmídeo pLHPETNIFH e induzidas com 0,5mM de IPTG por 4 horas (Figura 28A). As frações solúveis e insolúveis do extrato celular foram analisadas em géis SDS-PAGE 12%. A Figura 28 mostra que a proteína His-NifH (banda de aproximadamente 33kDa) permaneceu quase totalmente insolúvel mesmo com a adição de sarcosina 0,5% ao tampão de sonicação (Figura 28B). A proteína NifH foi solubilizada com a adição de uréia 5M a fração do precipitado (material e métodos).

A proteína His-NifH solubilizada com uréia foi purificada em cromatografia de afinidade em coluna HiTrap chelating (GE - Healthcare) carregada com cloreto de níquel. A proteína His-NifH foi eluída com 100mM de imidazol e analisada em gel SDS-PAGE (Figura 28C). As amostras com maior grau de pureza foram agrupadas e dialisadas. Após a diálise para a retirada da uréia, a proteína NifH tornou-se novamente insolúvel, aparecendo no precipitado. A proteína precipitada foi estocada a -70°C .

Para avaliar o grau de pureza da proteína His-NifH uma amostra contendo $3\mu\text{g}$ da proteína foi submetida à eletroforese SDS-PAGE sendo o gel corado com coomassie blue (Figura 28C). A análise densitométrica realizada (programa LabWorks – UVP) indicou uma pureza de 99%. Os dados da purificação estão mostrados no quadro abaixo:

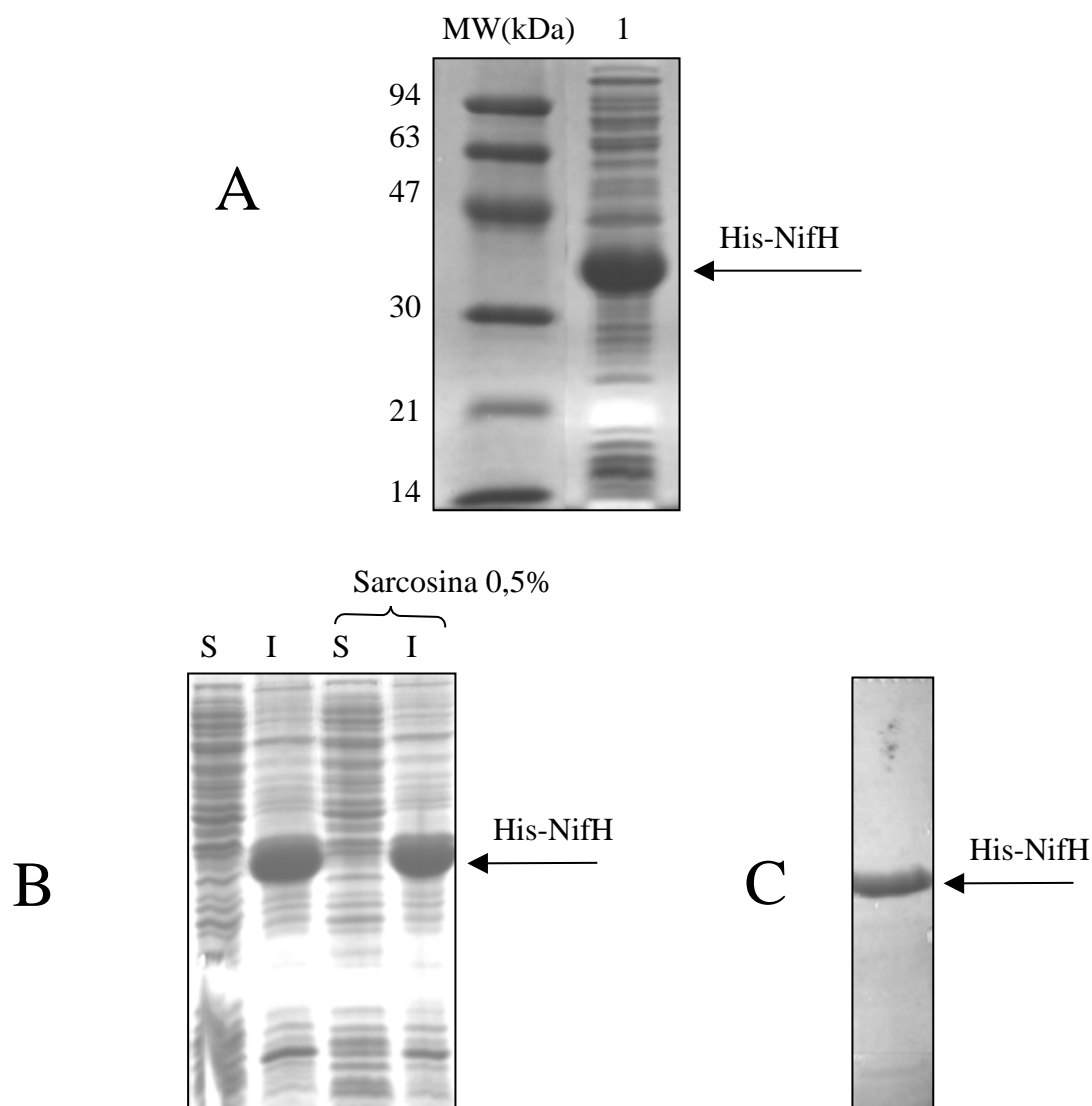
Volume de cultura*	Fração mais concentrada	Total de proteína purificada ⁺	Pureza [#]
200mL	$2\mu\text{g}/\mu\text{L}$	6mg	99%

* Células de *E. coli* BL21(λ DE3) *pLysS* cultivadas em LB após indução com IPTG 0,5mM, aproximadamente 10^9 células por mL.

⁺ Soma das proteínas totais presentes nas frações consideradas puras após a cromatografia.

[#] Análise por densitometria de gel SDS-PAGE corado com coomassie blue contendo $3\mu\text{g}$ de proteína purificada.

Figura 28 – Eletroforese da expressão e purificação da proteína His-NifH

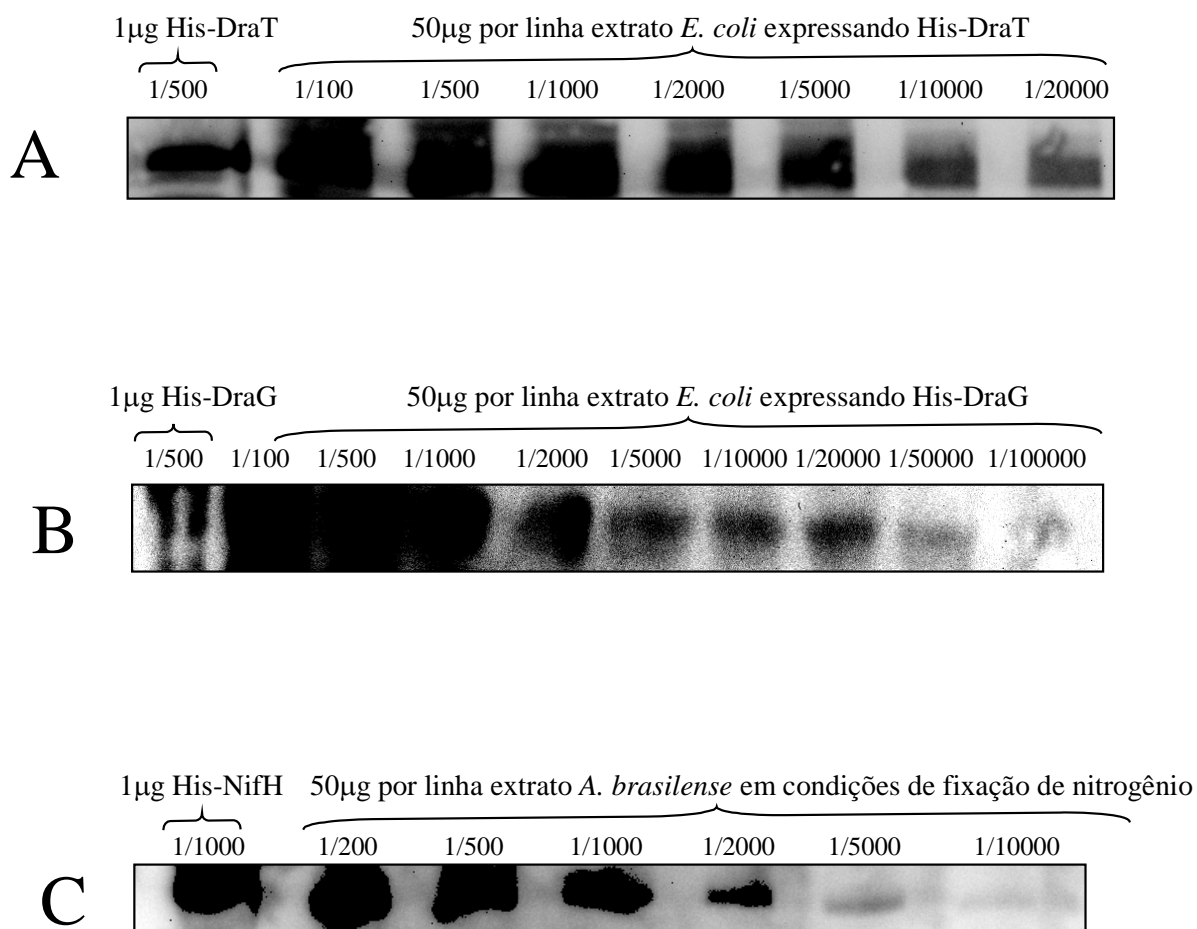


Gel A – MW, marcador de massa molecular em kDa. Linha 1, extrato proteico de *E. coli* BL21 após a expressão da proteína His-NifH a partir do plasmídeo pLHPETNIFH. Gel B – Frações solúvel (S) e insolúvel (I) de extratos celulares expressando a proteína His-NifH na presença ou ausência de sarcosina 0,5% no tampão de sonicação. Gel C – Proteína His-NifH (3µg) após solubilização com uréia 5M e purificação. As eletroforeses foram realizadas em SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados com Coomassie Blue.

5.4.4 Produção de anticorpos policlonais contra as proteínas His-DraT, His-DraG e His-NifH

As proteínas His-DraT, His-DraG e His-NifH de *A. brasilense* purificadas a partir de *E. coli* BL21(λ DE3) *pLysS* foram utilizadas para a produção de anticorpos policlonais em coelhos. Os anticorpos obtidos contra as proteínas DraT e DraG foram capazes de reconhecer as respectivas proteínas superexpressas em *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* em diluições de até 1/20.000 (Figura 29), entretanto estes anticorpos não foram capazes de reconhecer suas respectivas proteínas em extratos celulares de *A. brasilense* (dados não mostrados). Isto se deve provavelmente à baixa expressão destas proteínas em *A. brasilense*. Em *R. rubrum* foi sugerido que as proteínas DraT e DraG representem algo em torno de 0,002% da proteína total celular. Os anticorpos obtidos contra a proteína NifH foram capazes de reconhecer a proteína NifH em extratos de *A. brasilense* obtidos em condições de fixação de nitrogênio em diluições de até 1/5.000 (Figura 29).

Figura 29 – Imunodeteccção das proteínas His-DraT, His-DraG e NifH



Imunodeteccção utilizando anticorpos policlonais contra as proteínas indicadas realizada conforme descrito em Material e Métodos. A – Imunodeteccção da proteína His-DraT superexpressa em extratos de *E. coli* BL21. B - Imunodeteccção da proteína His-DraG superexpressa em extratos de *E. coli* BL21. C - Imunodeteccção da proteína NifH em extratos de *A. brasilense* obtido a partir de células fixando nitrogênio. Os ensaios foram realizados utilizando os respectivos anticorpos policlonais como descrito em material e métodos. A diluição do soro utilizada está indicada sobre cada linha. As proteínas His-DraT, His-DraG e His-NifH purificadas foram utilizadas como controle positivo em cada experimento.

5.4 Efeito da superexpressão de His-DraT, His-DraG e His-DraT + DraG sobre o desligamento-religamento da nitrogenase

O mecanismo pelo qual as enzimas DraT e DraG têm sua atividade controlada *in vivo* não é totalmente conhecido. Para se estudar a regulação de DraT e DraG foram construídas estirpes de *A. brasilense* capazes de superexpressar estas enzimas como proteínas de fusão contendo 6 resíduos de histidinas na região N-terminal (His) sob indução com IPTG (material e métodos item 4.22.3). Foi avaliado como a superexpressão das enzimas His-DraT, His-DraG e His-DraT + DraG nativa afetam a regulação pós-traducional da nitrogenase .

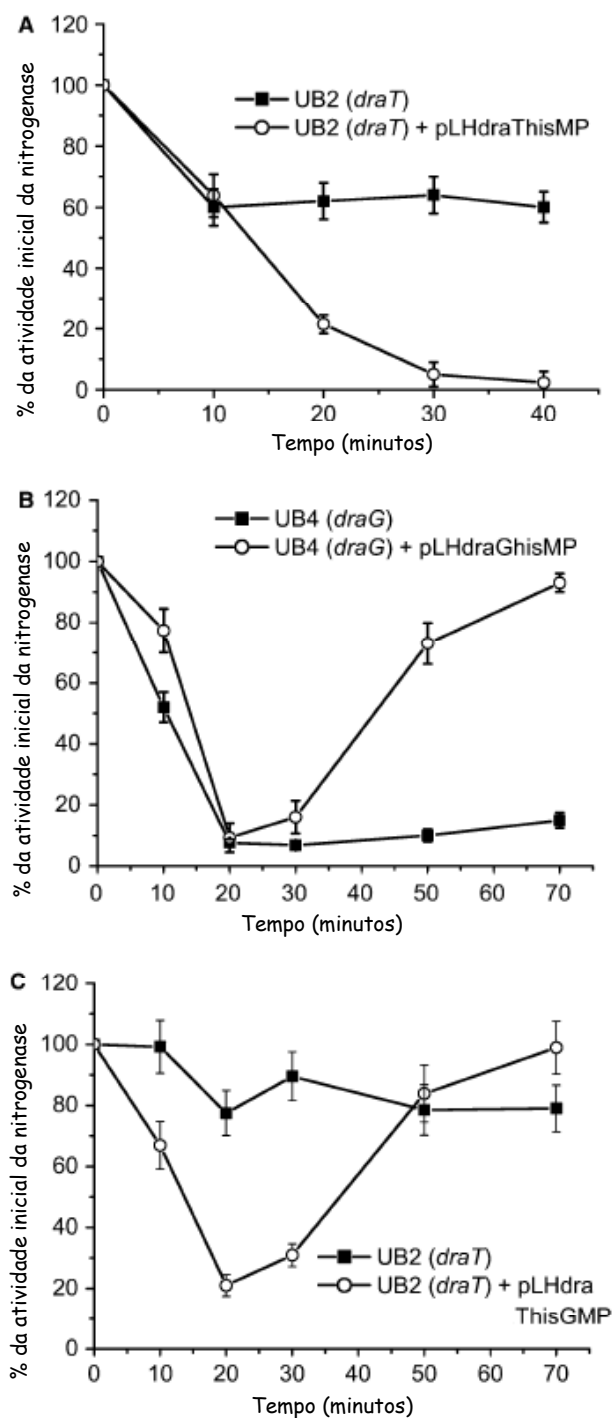
5.4.1 Complementação dos mutantes *draT* e *draG*

Para se verificar se as proteínas de fusão His-Dra e His-DraG são funcionais *in vivo* os plasmídeos pLHdraThisMP (expressa His-DraT), pLHdraGhisMP (expressa His-DraG) e pLHdraThisGMP (expressa His-DraT e DraG nativa) foram inseridos nas estirpes mutantes de *A. brasilense* UB2 (*draT*) e UB4 (*draG*). Os transconjugantes foram ensaiados para desligamento/religamento da nitrogenase induzido pela adição de amônio ao meio. Estes experimentos foram realizados na ausência de IPTG para evitar interferência do excesso de DraT e DraG, uma vez que estas enzimas são expressas em baixos níveis em células selvagens (LOWERY e LUDDEN , 1988; SAARI *et al.*, 1984). Nestas condições as proteínas são expressas apenas pelo escape de regulação do promotor *ptac*.

O mutante UB2 (*draT*) não foi capaz de desligar totalmente a enzima nitrogenase em resposta a adição de NH₄Cl 1mM ao meio de cultura (Figura 30A), confirmando dados anteriores (ZHANG *et al.*, 1992). Na presença do plasmídeo pLHdraThisMP (expressa His-DraT), a estirpe UB2 (*draT*) foi capaz de desligar completamente a enzima nitrogenase em resposta a adição de amônio ao meio (Figura 30A), indicando que a enzima His-DraT é funcional *in vivo*. Por outro lado, o mutante UB4 (*draG*) desliga a nitrogenase em resposta a adição de NH₄Cl 0,25mM (uma concentração mais baixa de amônio foi utilizada neste caso para observar o desligamento e o religamento da nitrogenase) porém, não foi capaz de reativá-la após o consumo do amônio adicionado ao meio (Figura 30B), confirmando dados já publicados (ZHANG *et al.*, 1992). Na presença do plasmídeo pLHdraGhisMP (expressa His-DraG), a estirpe UB4 (*draG*) foi capaz de reativar a enzima

nitrogenase após o consumo do amônio adicionado (Figura 30B), indicando que a enzima His-DraG também é funcional *in vivo*. A estirpe mutante UB2 (*draT*) não expressa a enzima *draG* já que a inserção do cassete de resistência a canamicina no gene *draT* gera um efeito polar em *draG* (ZHANG *et al.*, 1992). A funcionalidade das enzimas expressas a partir do plasmídeo pLHdraThisGMP (expressa His-DraT e DraG nativa) foi avaliada pela capacidade de complementar o fenótipo da estirpe UB2 (Figura 30C). Na presença do plasmídeo, a estirpe UB2 foi capaz de desligar a nitrogenase em resposta a adição de NH_4Cl 0,25mM, sendo a atividade retomada após a o consumo do amônio adicionado. Este resultado indica que as enzimas His-DraT e DraG, expressas a partir do plasmídeo pLHdraThisGMP, são funcionais *in vivo*.

Figura 30 – Complementação dos mutantes *draT* e *draG* com os plasmídeos pLHDRAThisMP, pLHDRAGhisMP e pLHDRAThisGMP

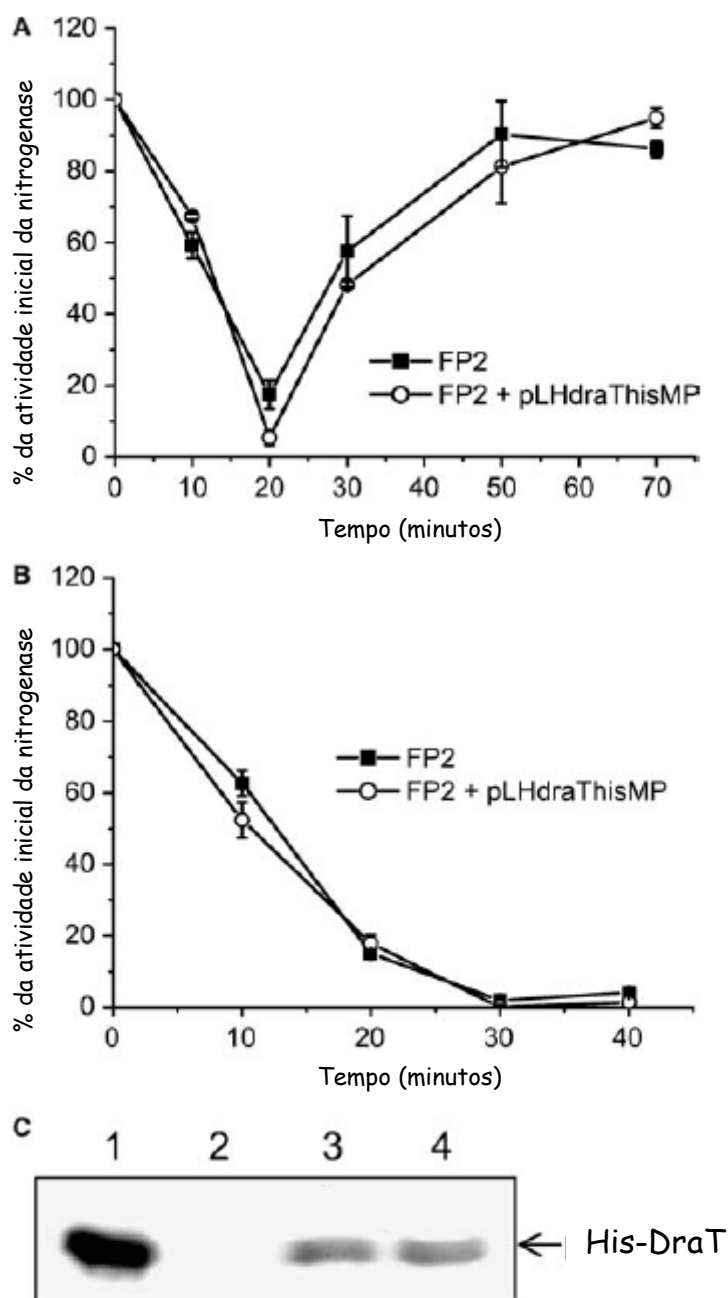


Células de *A. brasilense* foram desreprimidas para atividade da nitrogenase na ausência de IPTG por 20 a 24 horas antes do tempo zero, quando amônio foi adicionado ao meio. Acetileno foi adicionado 40 minutos antes do tempo zero. O etileno formado foi analisado nos tempos 10, 20 e 30 minutos após adição do acetileno para confirmar a linearidade da atividade da nitrogenase. Alíquotas de 0,5mL da fase gasosa foram retiradas e analisadas por cromatografia gasosa. A - O desligamento da nitrogenase foi avaliado em resposta a adição de NH₄Cl 1mM nas estirpes UB2 (*draT*) e UB2 (*draT*) + pLHDRAThisMP (expressa His-DraT). B - Adição de NH₄Cl 0,25mM nas estirpes UB4 (*draG*) e UB4 (*draG*) + pLHDRAGhisMP (expressa His-DraG). C - Adição de NH₄Cl 0,25mM nas estirpes UB2 (*draT*) e UB2 (*draT*) + pLHDRAThisGMP (expressa His-DraT e DraG nativa). Os resultados representam a média de duas culturas independentes, as barras indicam o desvio padrão.

5.4.2 Efeito da superexpressão de His-DraT, His-DraG e His-DraT + DraG sobre o desligamento/religamento da nitrogenase em resposta a amônio

O efeito da superexpressão de His-DraT sobre a regulação pós-traducional da nitrogenase foi determinada comparando-se a atividade da nitrogenase da estirpe selvagem (FP2) e da estirpe FP2 contendo o plasmídeo que expressa His-DraT (pLHdraThisMP) em resposta à adição de diferentes concentrações de amônio: 1- NH₄Cl 0,25mM (Figura 31A), concentração que produz um estímulo transitório permitindo a observação do desligamento e religamento da nitrogenase durante o tempo do experimento. 2- NH₄Cl 1mM (Figura 31B) concentração que produz um estímulo mais persistente permitindo apenas a observação do desligamento da nitrogenase durante o curso do experimento. Com a adição de IPTG 1mM a proteína His-DraT superexpressa representa quase 1% da proteína celular total como determinado por análise densitométrica do ensaio de western-blot utilizando-se a proteína His-DraT purificada como padrão (Figura 31C).

Figura 31 – Regulação da atividade da nitrogenase em resposta à adição de amônio em células superexpressando His-DraT



Células de *A. brasilense* selvagem (FP2) ou superexpressando His-DraT (FP2 + pLHdraThisMP) foram desreprimidas para atividade da nitrogenase na presença de IPTG 1mM por 20 a 24 horas antes do tempo zero, quando amônio foi adicionado ao meio. A- NH_4Cl 0,25mM, B- NH_4Cl 1mM Acetileno foi adicionado 40 minutos antes do tempo zero. O etileno formado foi analisado nos tempos 10, 20 e 30 minutos após adição do acetileno para confirmar a linearidade da atividade da nitrogenase. Alíquotas de 0,5mL da fase gasosa foram

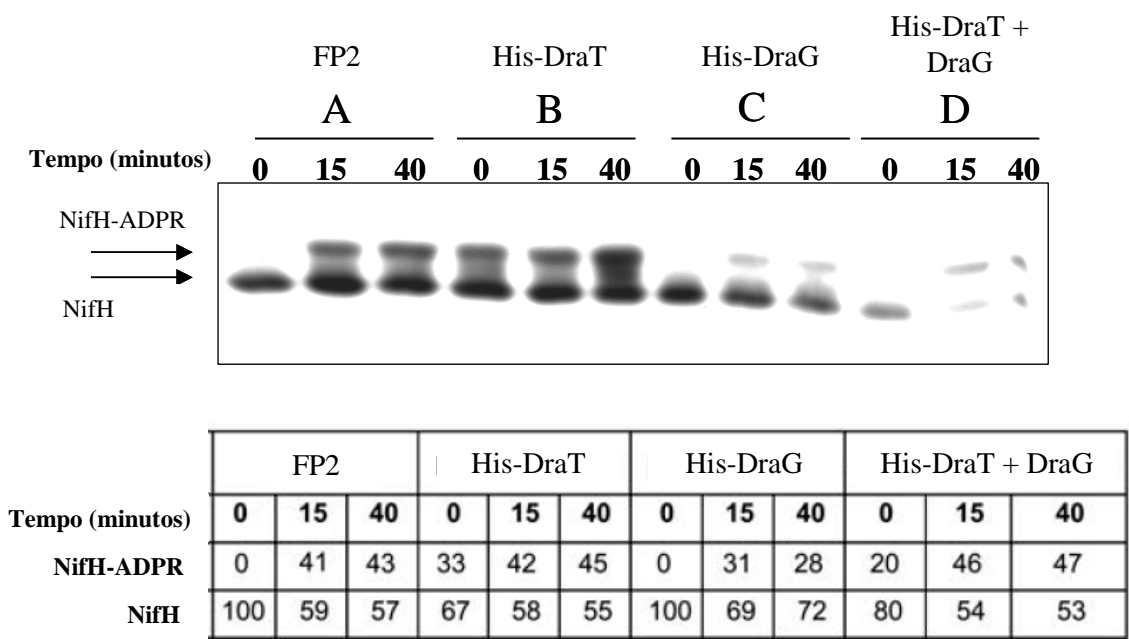
retiradas e analisadas por cromatografia gasosa. Os resultados representam a média de duas culturas independentes, as barras indicam o desvio padrão. C – Wester-blot das células superexpressando His-DraT. Linha 1 - 1 µg de His-DraT purificada; linha 2, *A. brasilense* FP2; linhas 3 e 4, *A. brasilense* FP2 + pLHdraThisMP. Para as linhas 2 a 4, 50µg de proteína total foram aplicados em cada linha, as amostras foram separadas em gel 12% SDS-PAGE. As amostras utilizadas foram as tratadas com NH₄Cl 0,25mM após os experimentos de desligamento/religamento.

Em ambas as concentrações de amônio, a superexpressão da proteína His-DraT não alterou o perfil de desligamento/religamento da nitrogenase em comparação com a estirpe selvagem. Entretanto, células superexpressando His-DraT apresentaram uma atividade inicial da nitrogenase 48% menor do que a observada na estirpe selvagem (15.6 e 8.3 nmol de etileno .min⁻¹.mg de proteína⁻¹ nas estirpes FP2 e FP2 + His-DraT, respectivamente) foi observada. A redução da atividade inicial da nitrogenase observada é decorrente da ADP-ribosilação parcial da proteína NifH antes da adição de amônio ao meio, como observado por ensaios de western-blot (Figura 32, comparar tempo zero de A e B). A proteína NifH não está totalmente modificada nestas condições provavelmente devido à atividade da enzima DraG expressa a partir do DNA cromossomal. Estes resultados indicam que a proteína His-DraT está ativa mesmo antes da adição de amônio quando superexpressa, sugerindo a titulação de um possível regulador negativo nestas condições.

Experimentos semelhantes ao descrito acima foram conduzidos com células superexpressando His-DraG (Figura 33). A proteína His-DraG superexpressa representa quase 1% da proteína celular total como determinado por análise densitométrica de células FP2 pLHdraGhisMP (expressa His-DraG) induzidas com IPTG (Figura 33C). Estas células apresentaram um desligamento parcial da nitrogenase após a adição de amônio (Figura 33A e 33B), cerca de 60% da atividade inicial da nitrogenase foi mantida após a adição de amônio ao meio. A análise do estado de modificação da proteína NifH nestas amostras indica que a proteína NifH não foi totalmente modificada após a adição de amônio como ocorre na estirpe selvagem (Figura 32). Em células superexpressando His-DraG, apenas 28% (corresponde a 56% de inibição da nitrogenase) dos monômeros da proteína NifH foram modificados após 40 minutos da adição de NH₄Cl 1mM, em contraste com a estirpe selvagem onde 43% dos monômeros de NifH foram encontrados

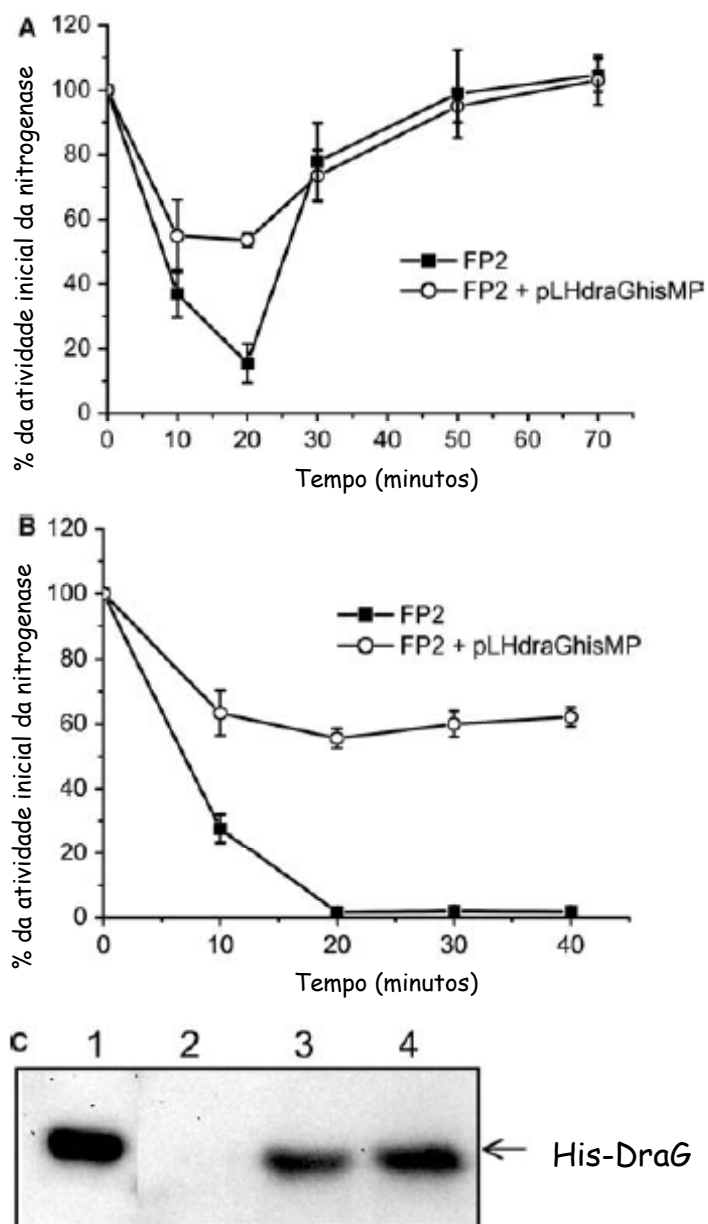
modificados. Estes resultados indicam que DraG permanece ativa após a adição de amônio quando superexpressa, sugerindo a titulação de um possível regulador negativo durante a superexpressão .

Figura 32 – Estado de ADP-ribosilação da proteína NifH em resposta à adição de amônio



Extratos celulares foram preparados a partir de células desreprimidas para atividade da nitrogenase em meio NFbHP glutamato na presença de IPTG 1mM. NH4Cl 1 mM foi adicionado as culturas (tempo zero) e amostras foram preparadas nos tempos 0, 15 e 40 minutos. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE seguido de western-blot usando anticorpo para NifH. (A) Estirpe selvagem FP2. (B) FP2 + pLHdraThisMP (superexpressa His-DraT). (C) FP2 + pLHdraGHisMP (superexpressa His-DraG). (D) FP2 + pLHdraThisGMP (superexpressa His-DraT e DraG nativa). As setas indicam a forma modificada (NifH-ADPR) e não modificada (NifH) da proteína NifH. A tabela indica a análise densitométrica do western blot. Os valores representam a porcentagem das formas livre e modificada da proteína NifH em relação ao sinal total para NifH.

Figura 33 – Regulação da atividade da nitrogenase em resposta à adição de amônio em células superexpressando His-DraG

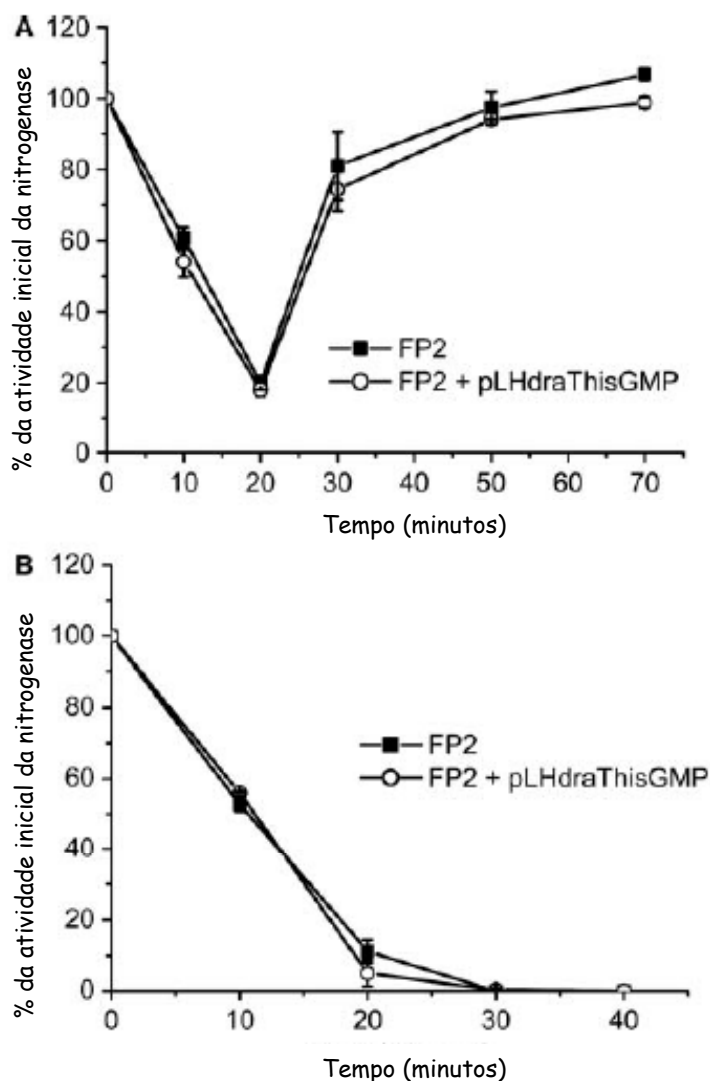


Células de *A. brasilense* selvagem (FP2) ou superexpressando His-DraG (FP2 + pLHdraGhisMP) foram desreprimidas para atividade da nitrogenase na presença de IPTG 1mM por 20 a 24 horas antes do tempo zero, quando amônio foi adicionado ao meio. A- NH₄Cl 0,25mM, B- NH₄Cl 1mM Acetileno foi adicionado 40 minutos antes do tempo zero. O etileno formado foi analisado nos tempos 10, 20 e 30 minutos após adição do acetileno para confirmar a linearidade da atividade da nitrogenase. Alíquotas de 0,5mL da fase gasosa foram

retiradas e analisadas por cromatografia gasosa. Os resultados representam a média de duas culturas independentes, as barras indicam o desvio padrão. C – Western-blot das células superexpressando His-DraG. Linha 1 – 1,5 µg de His-DraG purificada; linha 2, *A. brasilense* FP2; linhas 3 e 4, *A. brasilense* FP2 + pLHdraGhisMP. Para as linhas 2 a 4, 50µg de proteína total foram aplicadas em cada linha, as amostras foram separadas em gel 12% SDS-PAGE. As amostras utilizadas foram as tratadas com NH₄Cl 0,25mM coletadas após os experimentos de desligamento/religamento.

Foi também avaliada a regulação pós-traducional da nitrogenase em células superexpressando as proteínas His-DraT e DraG nativa simultaneamente (FP2 + pLHdraThisGMP). Nenhuma diferença na regulação da atividade da nitrogenase pode ser observada entre a estirpe FP2 e FP2 (pLHdraThisGMP) em resposta à adição de amônio ao meio (Figura 34). Entretanto, foi observada uma redução de 25% (em relação à estirpe selvagem) na atividade inicial da nitrogenase. Esta redução se deve à modificação parcial de NifH observada nos ensaios de western-blot (Figura 32). A modificação observada antes da adição de amônio é semelhante, porém menos intensa, que a observada em células superexpressando His-DraT (Figura 32). A menor intensidade de modificação em células superexpressando His-DraT e DraG simultaneamente ocorre provavelmente devido à atividade de DraG superexpressa.

Figura 34 – Regulação da atividade da nitrogenase em resposta à adição de amônio em células superexpressando His-DraT e DraG nativa



Células de *A. brasilense* selvagem (FP2) ou superexpressando His-DraT e DraG (FP2 + pLHdraThisGMP) foram desreprimidas para atividade da nitrogenase na presença de IPTG 1mM por 20 a 24 horas antes do tempo zero, quando amônio foi adicionado ao meio. A- NH_4Cl 0,25mM, B- NH_4Cl 1mM. Acetileno foi adicionado 40 minutos antes do tempo zero. O etileno formado foi analisado nos tempos 10, 20 e 30 minutos após adição do acetileno para confirmar a linearidade da atividade da nitrogenase. Alíquotas de 0,5mL da fase gasosa foram retiradas e analisadas por cromatografia gasosa. Os resultados representam a média de duas culturas independentes, as barras indicam o desvio padrão.

5.5 Análise da modificação e localização celular das proteínas NifH e P_{II} em resposta a um choque de amônio.

Várias evidências sugerem que proteínas da família P_{II} estejam envolvidas no controle da atividade das enzimas DraT e DraG em diversos organismos, entretanto, o mecanismo pelo qual este controle é exercido não é conhecido. Com a finalidade de investigar a possível participação das proteínas GlnB e GlnZ na ADP-ribosilação da proteína NifH em resposta a amônio, foram estabelecidas condições para seguir os ciclos de modificação das proteínas NifH, GS, GlnB e GlnZ em resposta à adição de amônio na estirpe selvagem e estirpes mutantes *glnB* e *glnZ*.

A atividade das enzimas DraT e DraG foi avaliada *in vivo* através da modificação da proteína NifH. Ensaios foram realizados a fim de verificar se a modificação de NifH, dependente de amônio, encontra-se sincronizada com a uridililação/desuridililação das proteínas GlnB e GlnZ. Células de *A. brasilense* expressando a enzima nitrogenase foram submetidas a um choque de amônio (NH₄Cl 200 µM), alíquotas foram coletadas antes e depois da adição de amônio. Foram analisadas as modificações pós-traducional das proteínas NifH e glutamina sintetase (GS) por SDS-PAGE e das proteínas GlnB e GlnZ por “native” PAGE seguido de “western blot” (Figuras 35A a 35D).

Em várias bactérias, incluindo *A. brasilense*, a enzima dodecamérica GS é modificada em resposta a adição de amônio, geralmente por adenililação de um resíduo de tirosina em cada uma das subunidades. Esta modificação leva a inativação progressiva da enzima GS quando os níveis de nitrogênio (glutamina) intracelular são elevados, conseqüentemente, a modificação da GS serve como um controle interno dos níveis de nitrogênio (glutamina) intracelular. A modificação da GS em *A. brasilense* difere daquela descrita em *E. coli* onde a proteína GlnB regula a atividade da enzima adenililtransferase (ATase) responsável pela adenililação de GS. Em *A. brasilense* as proteínas GlnB e GlnZ não influenciam significativamente a modificação da GS (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1998), sugerindo que a enzima ATase deve ser regulada apenas por efeito alostérico causado pela ligação a glutamina, como ocorre também em *E. coli* (JIANG *et al.*, 1998c).

A modificação das enzimas NifH e GS é sincronizada após a adição de amônio ao meio (Figuras 35A e 35B). A modificação destas proteínas pode ser

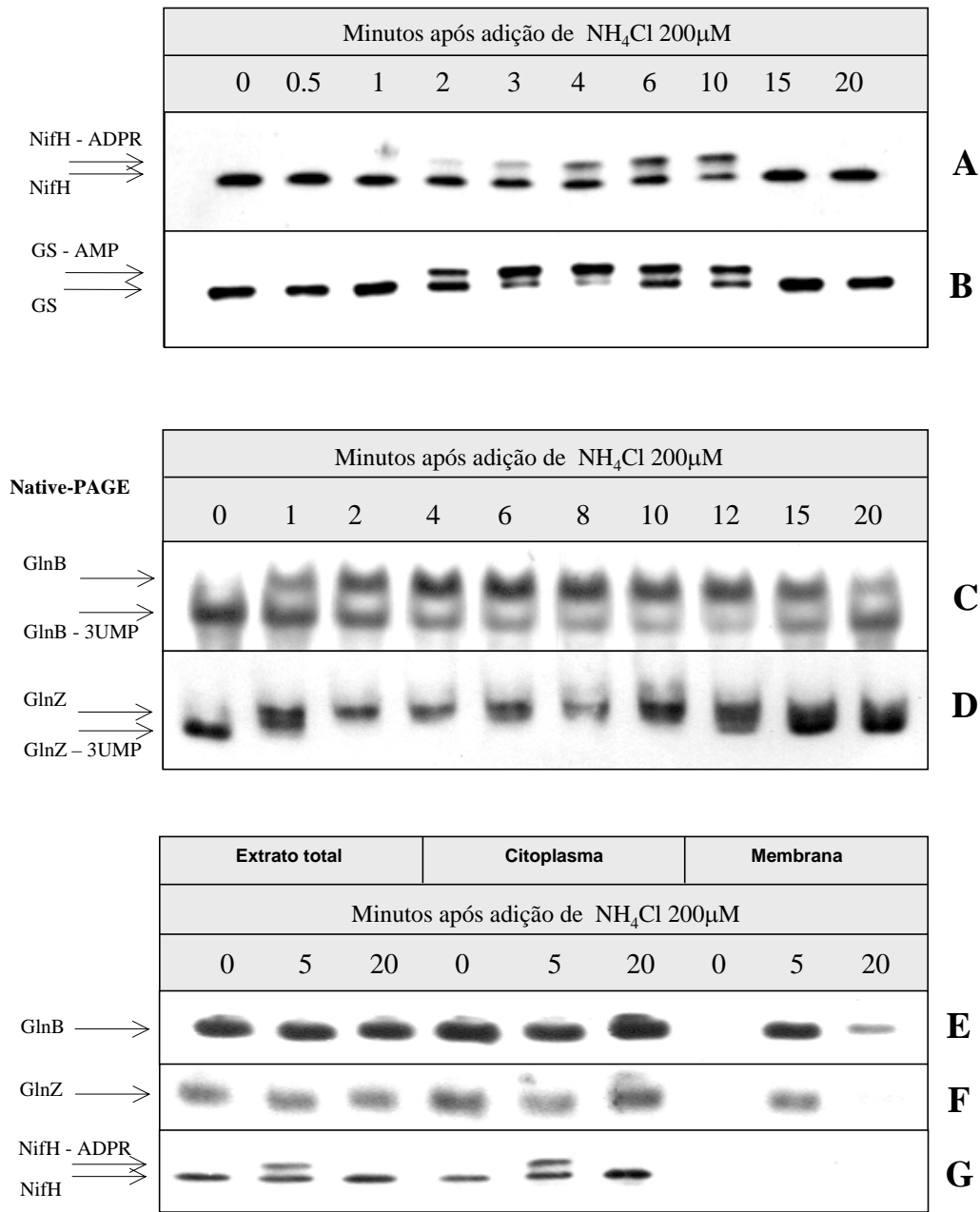
observada 2 minutos após a adição de amônio, o grupo covalentemente ligado é removido 15 após a adição de amônio, momento em que o amônio adicionado deve ter sido totalmente consumido pelo metabolismo bacteriano. Isto sugere que a modificação da proteína NifH está diretamente relacionada com o aumento nos níveis de glutamina intracelular, confirmando observações anteriores (HARTMANN *et al.*, 1987).

Devido à estrutura quaternária trimérica das proteínas da família P_{II}, GlnB e GlnZ podem existir em quatro diferentes formas de acordo com o estado de uridililação de cada trímero (0, 1, 2 ou 3 UMP), sendo que a forma totalmente uridililada apresenta a maior mobilidade em eletroforese realizada em condições nativas (ARAUJO *et al.*, 2004). Não foi possível distinguir as 4 possíveis formas das proteínas GlnB e GlnZ em eletroforese nativa (Figuras 35C e 35D), considerou-se que ambas as proteínas estejam na forma totalmente uridililada (3-UMP) antes da adição de amônio e que a banda com menor mobilidade observada após a adição de amônio, corresponde à forma totalmente desuridililada (0-UMP) (Figuras 35C e 35D). Esta hipótese é corroborada com o fato que quando um choque de amônio mais forte foi aplicado (NH₄Cl 20 mM por 20 minutos), a migração das proteínas GlnB e GlnZ foi comparável a banda de menor mobilidade presente nas Figuras 35C e 35D respectivamente (dados não mostrados). O perfil de modificação pós-traducional de GlnB e GlnZ após a adição de amônio foi um tanto diferente (Figuras 35C e 35D). A desuridililação de ambas as proteínas iniciou-se 1 minuto após a adição de amônio e foi completa após dois minutos para a proteína GlnZ, enquanto a desuridililação da proteína GlnB não foi completa em nenhum dos tempos analisados. A reuridililação da proteína GlnZ iniciou-se após 12 minutos e foi completa após 20 minutos, enquanto que a reuridililação da proteína GlnB iniciou-se após 15 minutos não estava completa após 20 minutos.

Em *E. coli* a uridililação/desuridililação da proteína GlnB pela enzima GlnD é um processo não cooperativo (ATKINSON *et al.*, 1994), ou seja, a uridililação/desuridililação de um monômero no trímero de GlnB não altera a eficiência de uridililação/desuridililação em outro monômero do trímero. Apesar de não ter sido possível resolver todas as possíveis formas da proteína GlnB, estes dados sugerem que este não é o caso para a proteína GlnB de *A. brasilense* uma

vez que apenas as formas GlnB-0UMP e GlnB-3UMP puderam ser observadas *in vivo* (Figura 35C).

Figura 35 – Perfil de modificação das proteínas NifH, GS, GlnB, GlnZ após choque de amônio na estirpe selvagem A. brasilense FP2



Células selvagem (FP2) expressando a enzima nitrogenase foram submetidas a um choque de amônio (NH₄Cl 200 μM) no tempo zero. Aliquotas foram coletadas, processadas e analisadas por “western blot” nos tempos indicados, conforme descrito em Material e Métodos. Extratos celulares foram submetidos a SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para NifH (A) ou GS (B). Extratos celulares totais foram submetidos a Native-PAGE seguido de

“western blot” usando anticorpo para GlnB (C) ou GlnZ (D). Extratos celulares totais, frações de citoplasma ou membrana foram submetidos a SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GlnB (E), GlnZ (F) ou NifH (G). As setas indicam as proteínas identificadas. NifH-ADPR indica a proteína NifH ADP-ribosilada; GS-AMP indica a proteína GS adenilada; GlnB-3UMP e GlnZ-3UMP indicam a proteína GlnB ou GlnZ, respectivamente, uridilada nas três subunidades.

Em *E. coli* as proteínas GlnB e GlnK se associam à fração de membrana quando as células recebem um choque de amônio (COUTTS *et al.*, 2002; JAVELLE *et al.*, 2004). Para determinar se o mesmo fenômeno ocorre em *A. brasilense*, a presença das proteínas GlnB e GlnZ foi verificada em frações de citoplasma e membrana antes e depois da adição de NH_4Cl 200 μM (Figuras 35E e 35F). A pureza das frações de membrana foi avaliada por “western blot” usando o anticorpo contra a proteína NifH que só está presente na fração de citoplasma (Figura 35G). Antes da adição de amônio ao meio, nenhum sinal para as proteínas GlnB ou GlnZ foi observado na fração de membrana; entretanto, 5 minutos após a adição de amônio, ambas as proteínas foram encontradas associadas à membrana. Após 20 minutos, quando os níveis de glutamina intracelular devem ter diminuído já que a enzima GS é desadenilada, apenas uma pequena fração de GlnB ainda está associada à membrana e GlnZ está presente apenas no citoplasma. Em *E. coli*, a ligação da proteína GlnK à membrana reflete seu estado de uridilação, só ocorrendo quando GlnK está completamente desuridilada. A comparação do perfil de uridilação e de ligação à membrana das proteínas GlnB e GlnZ em *A. brasilense* (comparar Figura 35C com 35E e Figura 35D com 35F) sugere que, como descrito em *E. coli*, ambas as proteínas só estão ligadas à membrana quando totalmente desuridiladas.

Os resultados descritos aqui até o presente indicam que a modificação da proteína NifH, ou seja, mudanças na atividade das enzimas DraT e DraG, está sincronizada com o estado de modificação e ligação à membrana das proteínas GlnB e GlnZ.

5.6 Efeitos da ausência da proteína GlnB na modificação pós-traducional de NifH, GS e GlnZ

Em *A. brasilense* a proteína GlnB parece ser necessária para a inativação da nitrogenase uma vez que a estirpe 7628(*glnB::km*) desliga parcialmente a

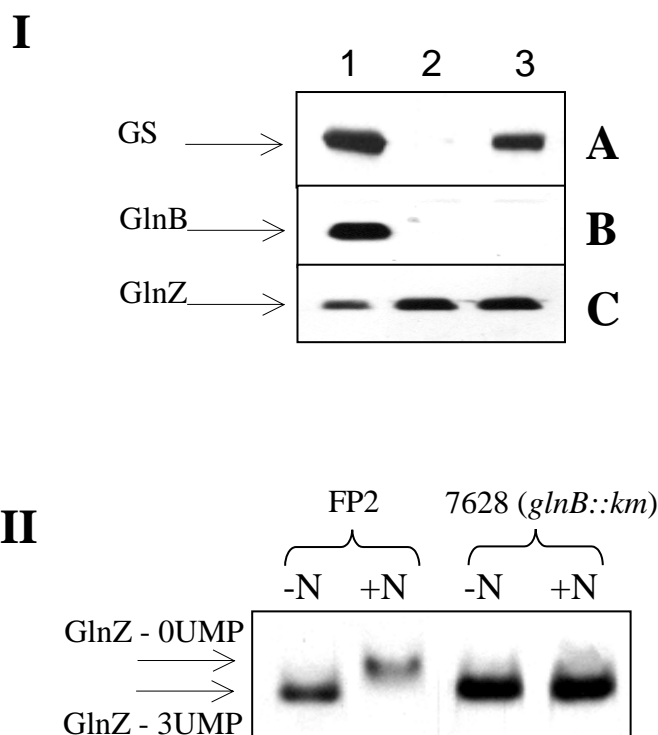
nitrogenase em resposta a adição de amônio ao meio (KLASSEN *et al.*, 2005). Em *A. brasilense* o gene que codifica para a enzima GS, *glnA*, está localizado a jusante do gene *glnB* e, em condições de limitação de nitrogênio, a expressão de *glnA* ocorre principalmente a partir dos promotores presentes a montante do gene *glnB* (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990; DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Como consequência, a inserção do cassete de resistência a canamicina no gene *glnB* é polar em *glnA*, causando redução na expressão da enzima GS. A atividade da enzima GS na estirpe 7628(*glnB::km*) foi reportada como sendo 5 vezes menor do que a observada na estirpe selvagem em células cultivadas sob limitação de nitrogênio (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996). A expressão de GS em condições limitantes de nitrogênio foi avaliada por “western blot” (Figura 36A), o sinal para GS foi praticamente indetectável no mutante 7628 (*glnB::km*), confirmando o forte efeito polar da inserção no gene *glnB*.

A modificação pós-traducional da proteína GlnZ na estirpe 7628 (*glnB::km*) foi avaliada após a adição de amônio (NH₄Cl 20mM por 20 minutos). Na estirpe selvagem a proteína GlnZ foi totalmente desuridilada em resposta a adição de amônio, entretanto, na estirpe 7628 (*glnB::km*) nenhuma desuridilação da proteína GlnZ pode ser detectada (Figura 36II). A interpretação inicial deste resultado foi de que a redução na expressão (e conseqüentemente atividade) da enzima GS na estirpe 7628(*glnB::km*) impediria que os níveis de glutamina intracelular aumentassem em resposta a adição de amônio no meio externo, impossibilitando a ativação da remoção de uridilil pela enzima GlnD.

Para tentar contornar o efeito polar apresentado pelo mutante 7628 (*glnB::km*) um mutante *glnB* não polar (LFH3) foi obtido utilizando-se o sistema λ -RED de *E. coli* (material e métodos item 4.27), esta foi a primeira vez que este sistema foi empregado para produção de mutantes em *A. brasilense*. A expressão da enzima GS no mutante LFH3 foi bem próxima à observada na estirpe selvagem (Figura 36A). Este mutante apresentou um padrão de modificação pós-traducional da enzima GS muito semelhante ao observado na estirpe selvagem em resposta a adição de amônio (Figura 37). Entretanto, surpreendentemente, a estirpe LFH3 também não foi capaz de desuridililar a proteína GlnZ em resposta a adição de amônio (NH₄Cl 20mM por 20 minutos) (dados não mostrados). Este resultado permanece sem explicação, mas sugere que a proteína GlnB seja necessária para

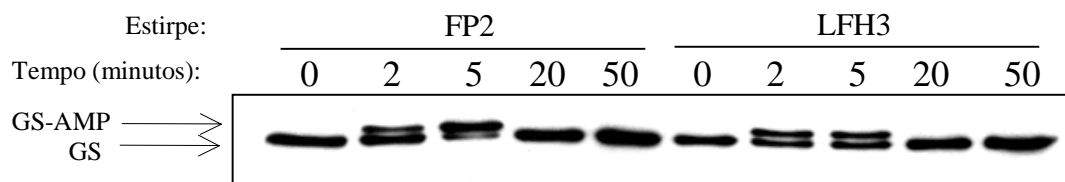
que a proteína GlnZ seja desuridililada. A expressão de GlnZ é aumentada em duas vezes na ausência de GlnB (DE ZAMAROCZY, 1998; Figura 36C), é possível que o aumento na expressão de GlnZ altere sua capacidade de ser desuridililada em resposta a adição de amônio ao meio.

Figura 36– Expressão de GS, GlnB, GlnZ e desuridililação de GlnZ nos mutantes *glnB*



I – Extratos celulares totais preparados a partir de células cultivadas meio NFbHP glutamato foram submetidos a SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GS (A), GlnB (B) ou GlnZ (C). Linha 1, estirpe selvagem FP2. Linha 2, estirpe 7628 (*glnB::km*). Linha 3, estirpe LFH3 (mutante *glnB* não-polar). II – Extratos celulares totais preparados de células cultivadas meio NFbHP glutamato coletadas antes (-N) ou 20 minutos depois (+N) da adição de NH_4Cl 20mM. As amostras foram submetidas a Native-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GlnZ. GlnZ-0UMP indica a proteína desuridililada e GlnZ-3UMP indica a proteína uridililada nas três subunidades.

Figura 37 – Adenililação e desadenililação de GS no mutante LFH3



Células de *A. brasilense* FP2 (selvagem) e LFH3 (mutante *glnB* não polar) foram cultivadas em meio NFbHP glutamato em condições de aeração que não permitem a expressão da enzima nitrogenase. As células foram submetidas a um choque de amônio (NH_4Cl 200 μM) no tempo zero. Alíquotas foram coletadas, processadas e analisadas por “western blot” usando anticorpo para GS nos tempos indicados, conforme descrito em Material e Métodos. As setas indicam a forma livre (GS) ou adenililada (GS-AMP) da proteína GS.

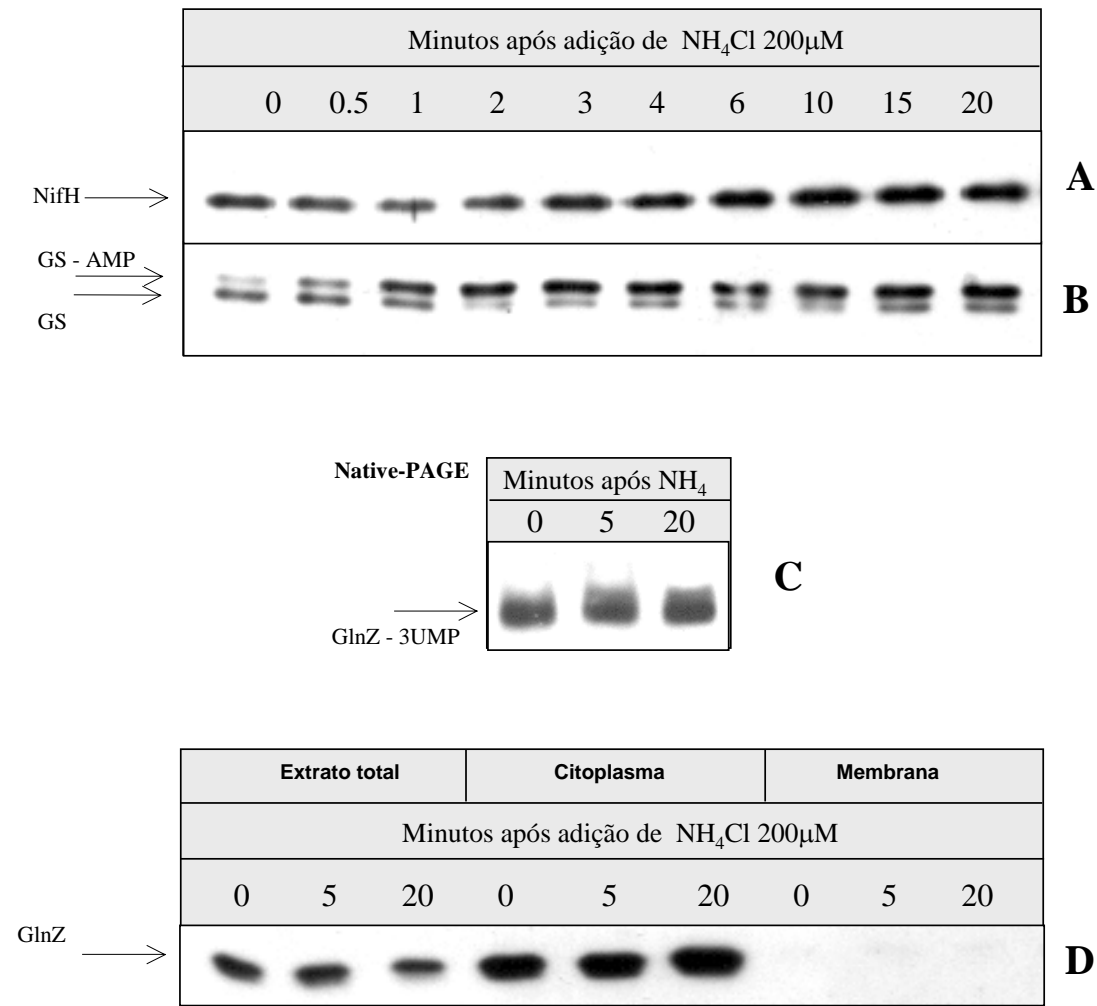
O mutante LFH3 foi utilizado para avaliar o efeito da ausência da proteína GlnB sob a modificação pós-traducional das enzimas NifH e GS em resposta a adição de amônio. Na ausência da proteína GlnB, NifH não é expressa porque a proteína ativadora da transcrição dos genes *nif* (NifA) requer GlnB para sua atividade (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Para estudar os possíveis efeitos da ausência da proteína GlnB sob a modificação pós-traducional da proteína NifH foi utilizado um plasmídeo (pEMS136) que expressa uma forma constitutivamente ativa da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae* (SOUZA *et al.*, 1999).

A estirpe LFH3 (pEMS136) não apresentou modificação da proteína NifH após a adição de amônio às células (Figura 38A). A enzima GS foi modificada, porém o padrão de modificação foi diferente do apresentado pela estirpe selvagem (comparar Figuras 35B e 38B). A proteína GlnZ não foi desuridilada (Figura 38C) e também não apresentou ligação à fração de membrana após a adição de amônio nesta estirpe (Figura 38D). A introdução do plasmídeo pJC1 (expressa o gene *glnB* de *A. brasilense*) na estirpe LFH3 restaurou o perfil selvagem de modificação das enzimas NifH e GS (dados não mostrados). A estirpe selvagem FP2, contendo o plasmídeo pEMS136, apresentou modificação da proteína NifH após a adição de amônio (dados não mostrados). Estes dados corroboram as observações de que a proteína GlnB é necessária para a modificação pós-traducional da proteína NifH após a adição de amônio (KLASSEN *et al.*, 2005). Porém, devido aos efeitos

pleiotrópicos apresentados pelo mutante *glnB*, fica impossível distinguir se este fenótipo ocorre devido a efeitos diretos ou indiretos da ausência da proteína GlnB sob as atividades de DraT e DraG.

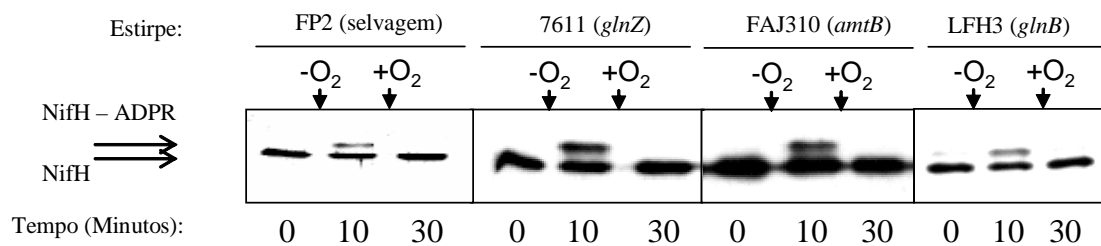
O mutante LFH3 apresentou um perfil selvagem de modificação da proteína NifH em resposta a anaerobiose (Figura 39), confirmando o não envolvimento de GlnB neste fenômeno, como previamente observado por KLASSEN e colaboradores (2005).

Figura 38 – Perfil de modificação das proteínas NifH, GS e GlnZ após choque de amônio na estirpe mutante LFH3



A estirpe não polar *glnB* LFH3 (pEMS136), expressando a enzima nitrogenase, foi submetida a um choque de amônio (NH_4Cl 200 μM) no tempo zero. As amostras foram coletadas, processadas e analisadas por “western blot” nos tempos indicados. Extratos celulares foram submetidos a SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para NifH (A) ou GS (B). Extratos celulares totais foram submetidos a Native-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GlnZ (C). Extratos celulares totais, frações de citoplasma e membrana foram submetidos a SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GlnZ (D). As setas indicam as proteínas identificadas. NifH-ADPR indica a proteína NifH ADP-ribosilada; GS-AMP indica a proteína GS adenilada, GlnZ-3UMP indica a proteína GlnZ uridilada nas três subunidades.

Figura 39 – Perfil de modificação da proteína NifH em resposta a anaerobiose nas estirpes mutantes *glnB*, *glnZ* e *amtB*

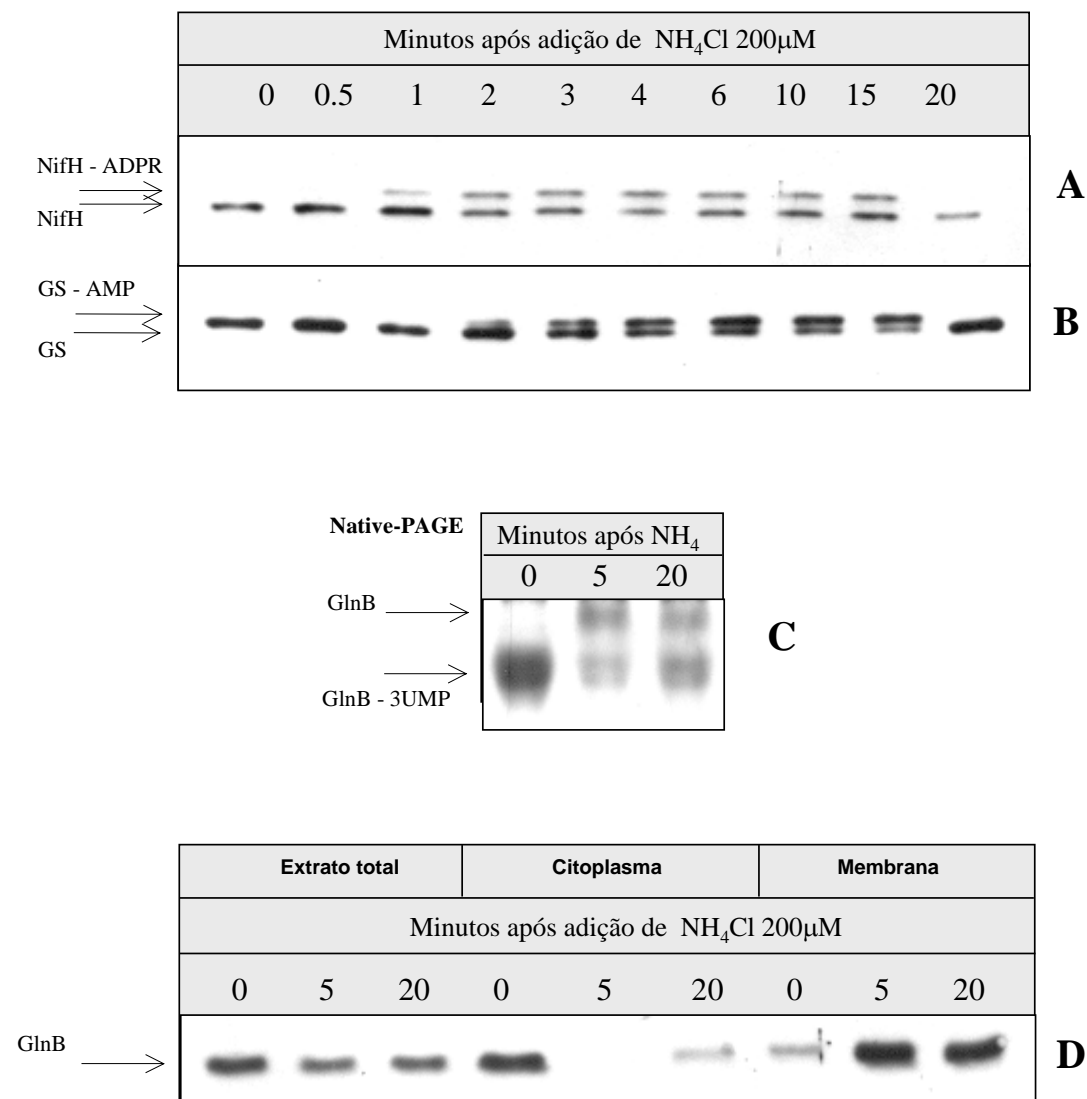


As estirpes FP2 (selvagem), 7611 (*glnZ*), FAJ310 (*amtB*) e LFH3 (*glnB*), expressando a enzima nitrogenase, foram submetidas a um choque anaeróbico mantendo-se a cultura sem agitação por 10 minutos (-O₂). As células foram retornadas a condição microaeróbica após este intervalo, pela agitação da cultura a 120rpm (+O₂). As amostras foram coletadas, processadas e analisadas por “western blot” nos tempos indicados. Extratos celulares foram submetidos a SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para NifH. As setas indicam as formas livre (NifH) e ADP-ribosilada (NifH-ADPR) da proteína NifH.

5.7 Efeitos da ausência da proteína GlnZ na modificação pós-traducional de NifH, GS e GlnB

Em um trabalho anterior foi mostrado que a proteína GlnZ é necessária para a reativação da nitrogenase após um choque de amônio (KLASSEN *et al.*, 2001). Para caracterizar mais detalhadamente este efeito, foram analisados os perfis de modificação pós-traducional das proteínas NifH, GS e GlnB no mutante 7611 (*glnZ*) usando as mesmas condições estabelecidas para a estirpe selvagem (Figura 40).

Figura 40 – Perfil de modificação das proteínas NifH, GS e GlnB após choque de amônio na estirpe 7611(*glnZ*)



A estirpe *glnZ* 7611, expressando a enzima nitrogenase, foi submetida a um choque de amônio (NH_4Cl 200 μM) no tempo zero. As amostras foram coletadas, processadas e analisadas por “western blot” nos tempos indicados. Extratos celulares foram submetidos a SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para NifH (A) ou GS (B). Extratos celulares totais foram submetidos a Native-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GlnB (C). Extratos celulares totais, frações de citoplasma e membrana foram submetidos a SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GlnB (D). As setas indicam as proteínas identificadas. NifH-ADPR indica a proteína NifH ADP-ribosilada; GS-AMP indica a proteína GS adenilada, GlnB-3UMP indica a proteína GlnB uridilada nas três subunidades.

A modificação da proteína NifH foi mais rápida e mais duradoura no mutante *glnZ* do que na estirpe selvagem (comparar Figuras 35A e 40A). A modificação da GS também foi alterada na ausência da proteína GlnZ, a adenililação e a desadenililação ocorreram mais lentamente no mutante (comparar Figuras 35B e 40B). No mutante *glnZ*, a proteína GlnB foi desuridilada e reuridilada de forma muito semelhante à observada na estirpe selvagem (comparar Figuras 35C e 40C) porém, a ligação da proteína GlnB à fração de membrana foi drasticamente alterada em relação à estirpe selvagem (comparar Figuras 35E e 40D). Na ausência de GlnZ, GlnB foi encontrada associada à fração de membrana antes da adição de amônio; 5 minutos após a adição de amônio, GlnB estava totalmente associada à fração de membrana, desaparecendo completamente do citoplasma. Após 20 minutos, uma grande fração de GlnB ainda permaneceu ligada à fração de membrana. Na ausência de GlnZ, a ligação de GlnB à membrana parece não depender necessariamente de sua desuridililação. Antes da adição de amônio ao meio, GlnB está totalmente uridilada e uma pequena fração se encontra ligada à membrana (Figuras 40C e 40D). Cinco minutos após o choque de amônio, GlnB está parcialmente desuridilada, porém encontra-se totalmente ligada à membrana (Figuras 40C e 40D). Estas observações sugerem que, quando GlnZ está ausente, GlnB tem maior afinidade para ligação à membrana citoplasmática.

O mutante *glnZ* apresentou um perfil selvagem de modificação da proteína NifH idêntico em resposta a anaerobiose (Figura 39), confirmando dados anteriores (KLASSEN *et al.*, 2001).

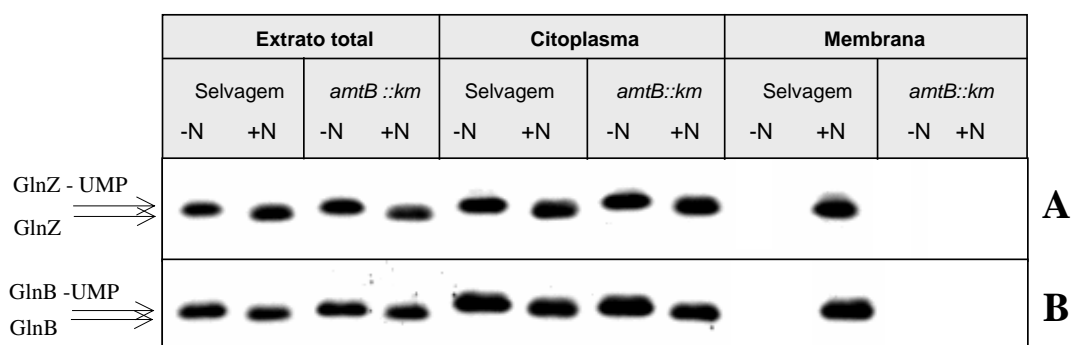
Em *E. coli* as proteínas GlnB e GlnK podem formar heterotrímeros *in vivo* quando as células são cultivadas em condições limitantes de nitrogênio (VAN HEESWIJK *et al.*, 2000). O perfil de migração em eletroforese nativa da proteína GlnB de *A. brasilense* foi similar nas estirpes selvagem (Figura 35C) e mutante *glnZ* (Figura 40C). Além disso, não foram observadas diferenças no perfil de migração da proteína GlnZ de *A. brasilense*, sob condições nativas, entre a estirpe selvagem (Figura 35D) e mutante *glnB* (Figura 38C). Estes dados sugerem que as proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* não formam heterotrímeros *in vivo*.

5.8 Dependência da proteína AmtB para a ligação das proteínas P_{II} à membrana

citoplasmática de *A. brasilense*

A ligação genética em um operon dos genes *glnK* e *amtB*, quase que invariável entre os procariotos levou a hipótese de que as proteínas GlnK e AmtB interagem fisicamente (THOMAS *et al.*, 2000a). Desde então tem sido mostrado que proteínas da família P_{II} interagem com a fração de membrana de uma forma AmtB-dependente em vários microrganismos (COUTTS *et al.*, 2002; DETSCH e STULKE, 2003; STROSSER *et al.*, 2004). Em *E. coli*, GlnK interage diretamente com AmtB e que tal interação só ocorre quando GlnK esta totalmente desuridililada. A formação do complexo GlnK-AmtB tem como consequência o bloqueio da atividade da proteína AmtB (COUTTS *et al.*, 2002; JAVELLE *et al.*, 2004). *A. brasilense* é uma das poucas exceções onde o gene *amtB* é expresso de forma monocistrônica não sendo expresso em um operon com um gene da família P_{II} (VAN DOMMELEN *et al.*, 1998). Neste trabalho, foi examinado se a ligação à membrana das proteínas GlnB e GlnZ, induzida por amônio (Figuras 35E e 35F) era dependente da proteína AmtB. Os resultados indicam que as proteínas GlnB e GlnZ não se ligam à membrana após um choque de amônio no mutante *amtB* (Figura 41).

Figura 41 – As proteínas GlnB e GlnZ se ligam à fração de membrana de forma dependente de AmtB após choque de amônio



A. brasilense FP2 (selvagem) ou FAJ310 (*amtB::km*), expressando a enzima nitrogenase, foram coletados antes (-N) ou 20 minutos depois (+N) da adição de 20 mM NH₄Cl. Extratos celulares totais, frações de citoplasma e membrana foram submetidos a SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GlnZ (A) ou GlnB (B). As setas indicam as proteínas uridililadas (-UMP) ou desuridililadas.

O mutante *amtB* poderia, potencialmente, apresentar uma menor captação de amônio do meio externo em relação à estirpe selvagem, porém, trabalhos anteriores mostraram que este mutante apresenta a mesma taxa de captação de amônio observada na estirpe (VAN DOMMELEN *et al.*, 1998). Mesmo assim, foi utilizado um forte choque de amônio (NH₄Cl 20mM por 20 minutos) no experimento descrito na Figura 41 para garantir que o influxo de amônio nestas condições ocorra de forma independente de AmtB. Este choque de amônio levou a uma desuridililação de GlnB e GlnZ no mutante *amtB* semelhante à observada estirpe selvagem (Figura 41) comprovando que o influxo de amônio não é afetado na ausência da proteína AmtB.

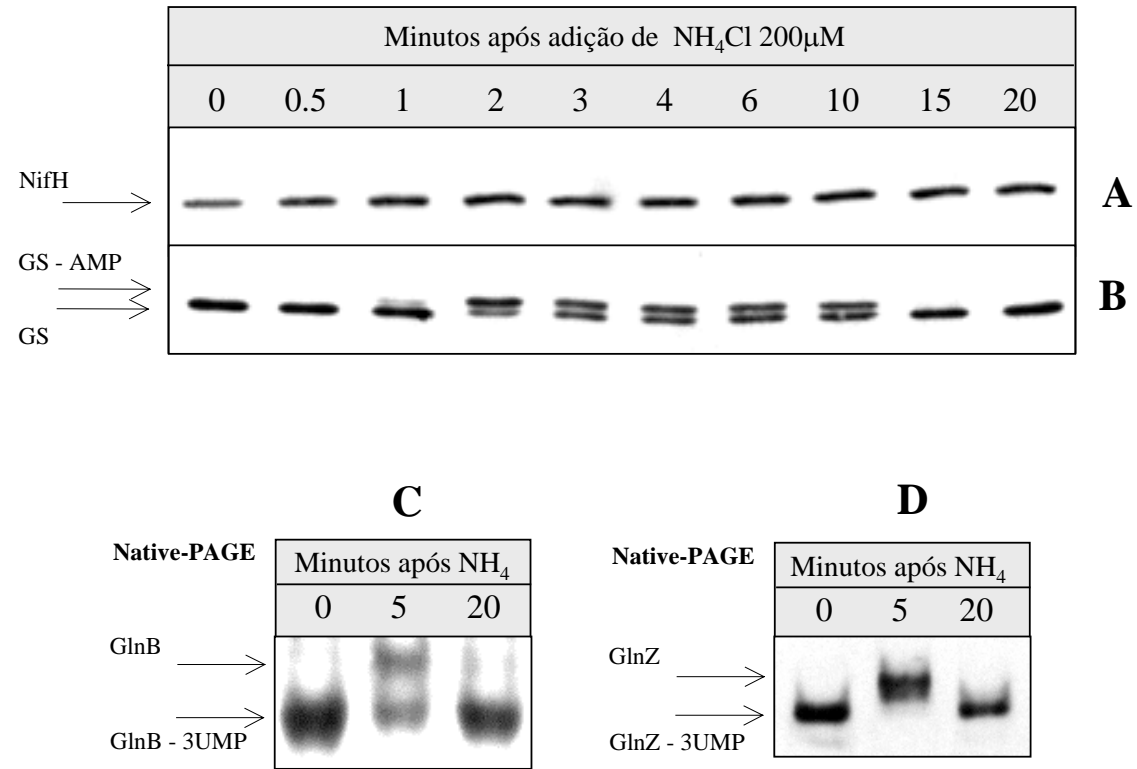
5.9 Modificação pós-traducional da proteína NifH e inativação da nitrogenase em resposta à adição de amônio na ausência da proteína AmtB

Em *R. capsulatus* e *Azoarcus* sp. a proteína canal para amônia AmtB é necessária para a ADP-ribosilação da proteína NifH induzida por amônio (YAKUNIN e HALLENBECK, 2002; MARTIN e REINHOLD-HURECK, 2002). Para examinar se a proteína AmtB também está envolvida da modificação da proteína NifH em *A. brasilense*, os mesmos experimentos conduzidos para a estirpe selvagem (Figura 35) foram realizados usando uma estirpe mutante FAJ310(*amtB::km*). Nenhuma modificação da proteína NifH foi observada após a adição de NH₄Cl 200 µM (Figura 42A), entretanto, a introdução de um plasmídeo (pFAJ309) que expressa o gene *amtB* de *A. brasilense* no mutante FAJ310(*amtB::km*) restaurou o fenótipo selvagem de modificação da proteína NifH após a adição de amônio (dados não mostrados). A ausência da proteína AmtB não alterou a modificação da proteína GS após a adição de amônio e nem a desuridililação das proteínas GlnB e GlnZ (comparar Figuras 35B com 42B, 35C com 42C, 35D com 42D). Estes resultados indicam que a ausência da proteína AmtB não afeta substancialmente a captação de amônio nas condições utilizadas.

Quando um choque de amônio mais intenso foi aplicado (NH₄Cl 20 mM), bandas bem fracas referentes à proteína NifH ADP-ribosilada puderam ser observadas (Figura 43B). Como previsto pelo estado de modificação da proteína NifH, a atividade da enzima nitrogenase no mutante FAJ310 não foi completamente inibida após a adição de amônio (NH₄Cl 20 mM), enquanto que na estirpe selvagem a atividade foi completamente inibida (Figura 43A).

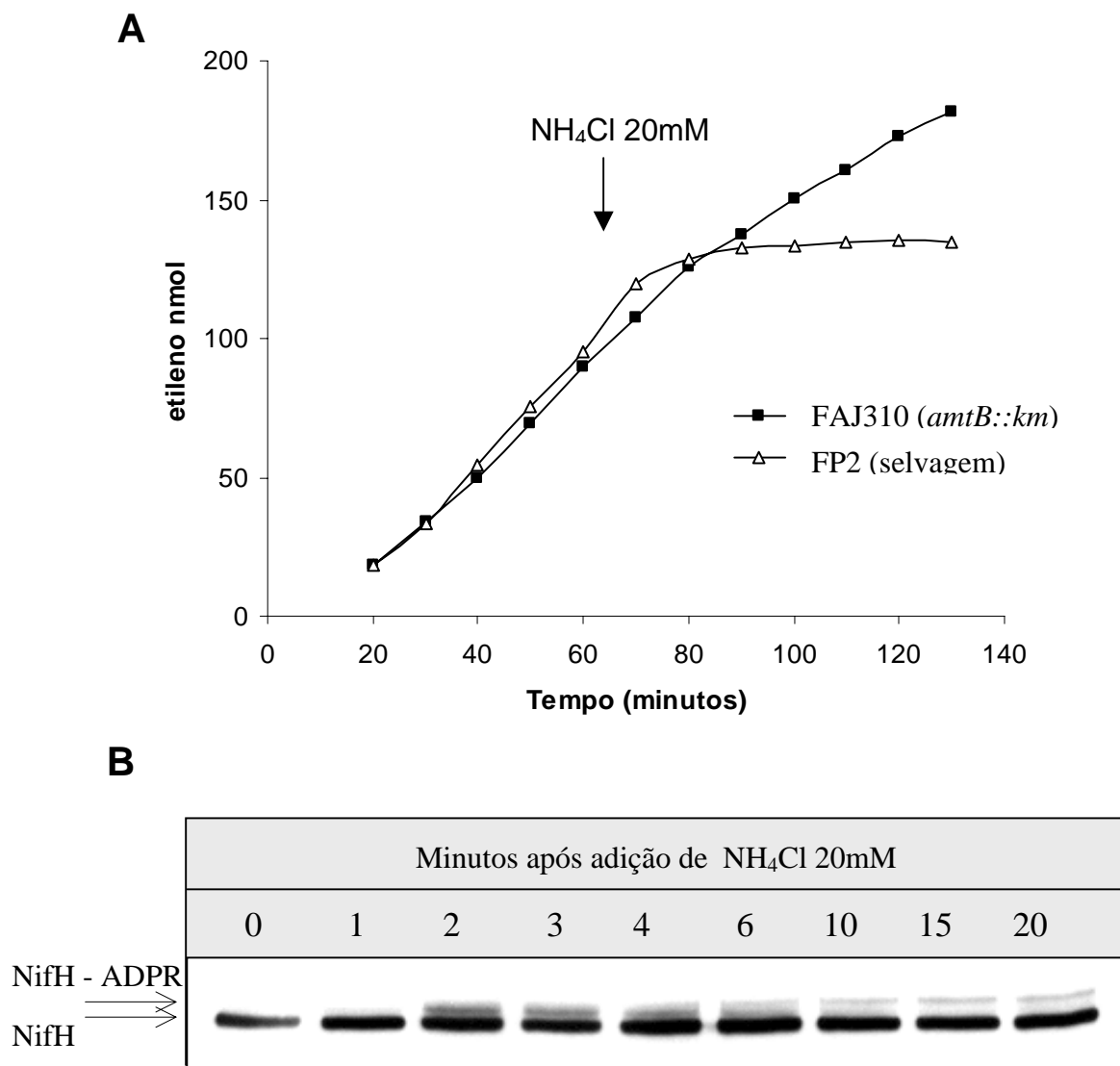
A modificação da proteína NifH induzida por anaerobiose foi semelhante nas estirpes FP2 (selvagem) e FAJ310 (*amtB::km*) (Figura 39), corroborando resultados anteriores os quais indicam que a modificação da proteína NifH induzida por amônio e por anaerobiose ocorre por diferentes vias de sinalização (ZHANG *et al.*, 1994).

Figura 42 – Perfil de modificação das proteínas NifH, GS, GlnB e GlnZ após choque de amônio na estirpe FAJ310 (*amtB*)



Células de *A. brasilense* FAJ310 (*amtB::km*) expressando a enzima nitrogenase, foram submetidas a um choque de amônio (NH_4Cl 200 μM) no tempo zero. Extratos celulares foram submetidos a SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para NifH (A) ou GS (B). Extratos celulares totais foram submetidos a native-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GlnB (C) ou GlnZ (D). As setas indicam as proteínas identificadas. GS-AMP indica a proteína GS adenilada, GlnB-3UMP e GlnZ-3UMP indicam as proteínas GlnB e GlnZ uridilada nas três subunidades, respectivamente

Figura 43 – Perfil de desligamento e modificação da nitrogenase após choque de amônio na estirpe FAJ310 (*amtB*)



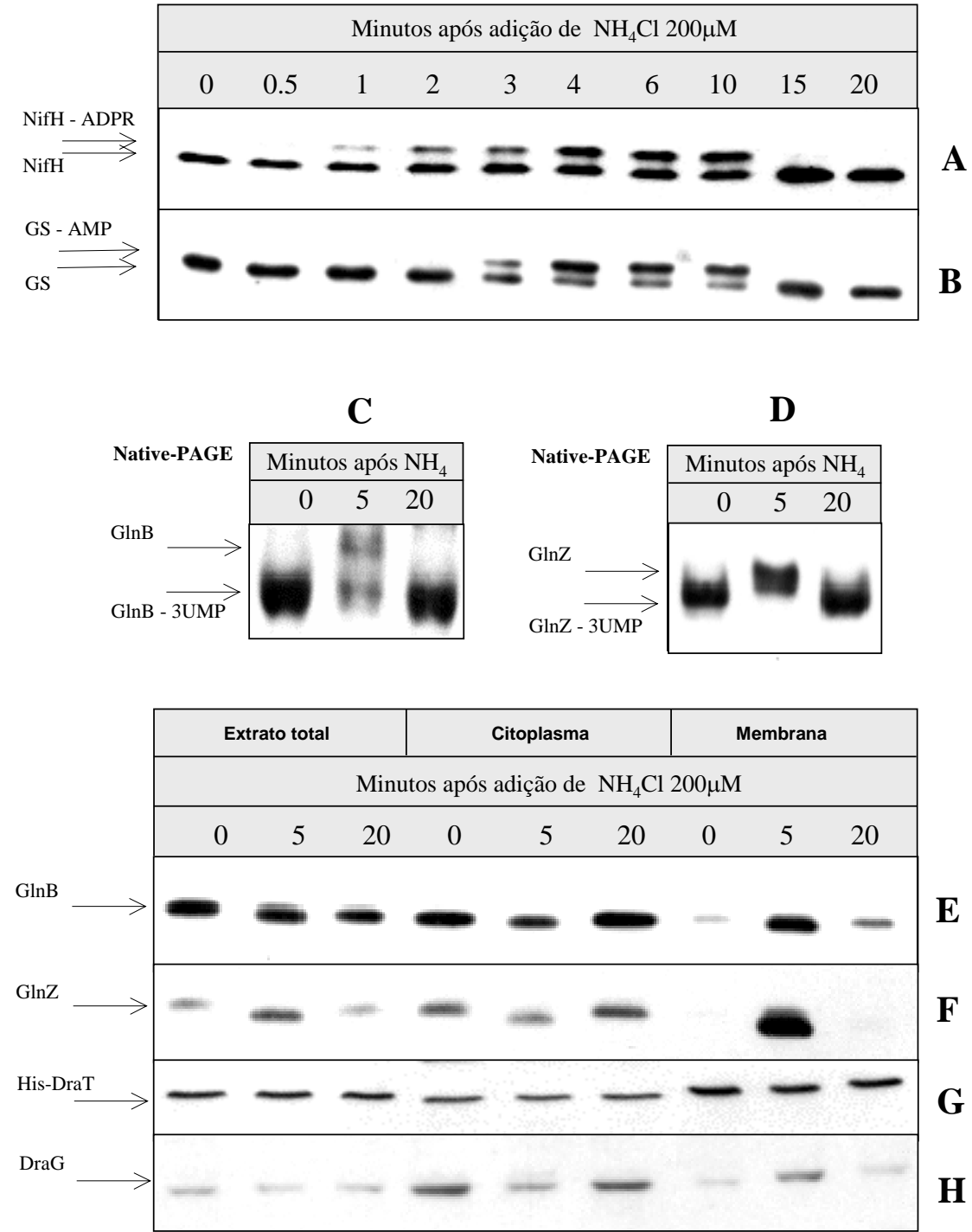
As estirpes de *A. brasilense* FP2 (selvagem) e FAJ310 (*amtB*⁻), desreprimidas para atividade da nitrogenase foram ensaiadas para atividade da nitrogenase *in vivo* pelo método de redução do acetileno (A). Alíquotas da fase gasosa foram coletadas nos tempos indicados e analisadas por cromatografia gasosa. Os dados indicam nmol de etileno formado por 0,5mL da fase gasosa. A seta indica o ponto onde NH_4Cl 20 mM foi injetado. O mesmo perfil de desligamento da nitrogenase foi observado em outro experimento independente. (B) Células *A. brasilense* FAJ310 (*amtB::km*), expressando a enzima nitrogenase, foram submetidas a um choque de amônio (NH_4Cl 20 mM) no tempo zero. Extratos celulares foram submetidos a SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para NifH. NifH-ADPR indica a proteína NifH ADP-ribosilada.

5.10 Localização celular da proteína DraG após um choque de amônio

Os resultados descritos até então indicam que em *A. brasilense*, assim como em *R. capsulatus* e *Azoarcus* sp., a proteína AmtB é necessária para a modificação da proteína NifH induzida por amônio. Estes resultados suportam a idéia de que a proteína AmtB atua como um sensor de amônio extracelular. Porém ainda não está claro como a proteína AmtB pode transmitir a presença de amônio no meio extracelular e alterar a atividade das enzimas DraT e DraG, as quais controlam a ADP-ribosilação da proteína NifH. Trabalhos anteriores em *R. rubrum* sugerem que a ligação da proteína DraG à fração de membrana seria um elemento crítico na regulação da atividade desta enzima, com a ligação a membrana causando a inativação de DraG (NOREN e NORDLUND, 1997). Esta hipótese foi sugerida uma vez que a enzima DraG de *R. rubrum* é sempre encontrada na fração de membrana em extratos celulares.

Com a finalidade de verificar se a enzima DraG poderia ser regulada por ligação à membrana, a localização celular de DraG foi avaliada em diferentes condições de disponibilidade de nitrogênio. As enzimas DraT e DraG são expressas em baixos níveis (SAARI *et al.*, 1984), portanto não foi possível a detecção destas enzimas por “western blot” (dados não mostrados). Com a finalidade de aumentar os níveis de expressão destas enzimas, foi usado o plasmídeo (pLHDraThisGMP), que expressa uma versão da enzima DraT com uma cauda de 6 histidinas na região N-terminal (His-DraT) e a enzima DraG nativa, ambas sob controle do promotor induzível *ptac*. O plasmídeo pLHThisGMP foi introduzido na estirpe UB2 (*draT::km*, mutação polar em *draG*) de *A. brasilense*. Para evitar a potencial titulação de reguladores das enzimas DraT e DraG o promotor *ptac* não foi induzido uma vez que His-DraT e DraG puderam ser detectadas nestas condições. Com a adição de NH₄Cl 200 µM, a estirpe UB2(pLHThisGMP) apresentou um padrão de modificação pós-traducional das proteínas NifH, GS, GlnB e GlnZ semelhante ao observado na estirpe selvagem (comparar Figura 35 de A a D com Figura 44 de A a D).

Figura 44 – Perfil de modificação das proteínas NifH, GS, GlnB e GlnZ após choque de amônio na estirpe UB2 (pLHdraThisGMP)



Células de *A. brasilense* UB2(pLHdraThisGMP) expressando a enzima nitrogenase foram submetidas a um choque de amônio (NH_4Cl 200 μM) no tempo zero. Alíquotas foram coletadas, processadas e analisadas por “western blot” nos tempos indicados, conforme descrito em Material e Métodos. Extratos celulares foram submetidos a SDS-PAGE seguido

de “western blot” usando anticorpo para NifH (A) ou GS (B). Extratos celulares totais foram submetidos a Native-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GlnB (C) ou GlnZ (D). Extratos celulares totais, frações de citoplasma ou membrana foram submetidos a SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GlnB (E), GlnZ (F), DraT (G) ou DraG (H). As setas indicam as proteínas identificadas. NifH-ADPR indica a proteína NifH ADP-ribosilada; GS-AMP indica a proteína GS adenililada; GlnB-3UMP e GlnZ-3UMP indicam a proteína GlnB ou GlnZ, respectivamente, uridililada nas três subunidades.

Frações de citoplasma e membrana foram monitoradas para a presença das proteínas GlnB, GlnZ, DraT e DraG por “western blot” antes e depois de um choque de amônio. O padrão de ligação à membrana das proteínas GlnB e GlnZ foi semelhante ao observado com a estirpe selvagem (comparar Figuras 35E e 35F com Figuras 44E e 44F). A enzima DraT foi encontrada nas frações de membrana e citoplasma, porém a quantidade relativa do sinal para DraT nas diferentes frações não sofreu alteração de acordo com os níveis de nitrogênio na célula (Figura 44G). Por outro lado, a enzima DraG foi substancialmente associada à fração de membrana 5 minutos após a adição de amônio ao meio, retornando para o citoplasma após 20 minutos (Figura 44H). A distribuição relativa de DraG entre as frações de citoplasma e membrana (baseado em dois experimentos independentes) foi de 88:12, 26:74 e 73:28 para os tempos 0, 5 e 20 minutos respectivamente. Como DraG está superexpressa nas condições experimentais utilizadas, o fato de que DraG não ter sido encontrada totalmente associada à fração de membrana após 5 minutos pode ser devido à titulação do possível receptor para DraG presente na membrana, ou devido à dissociação parcial de DraG da fração de membrana durante o processamento da amostra. É provável que, em células selvagens, DraG seja totalmente ligada a membrana após um choque de amônio *in vivo*.

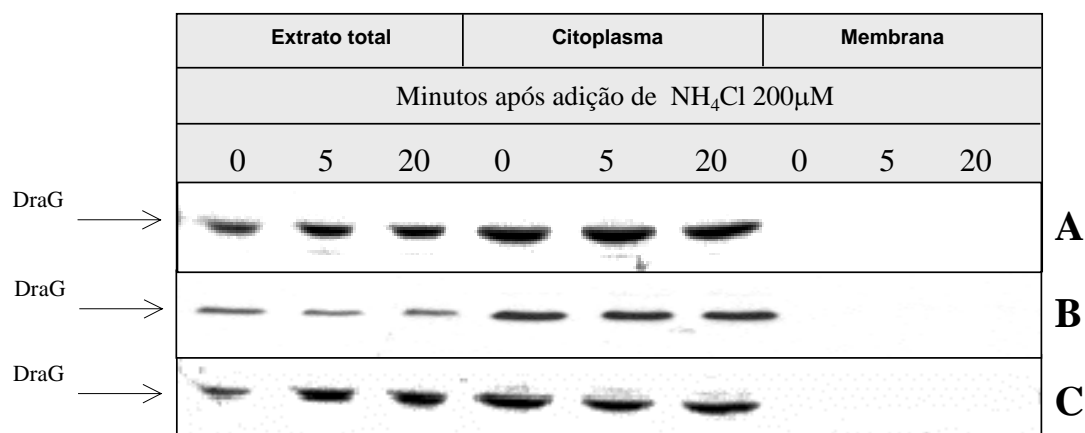
A ligação de DraG à membrana está claramente relacionada com o perfil de modificação da proteína NifH. Nos tempos 0 e 20 minutos, quando NifH não está modificada (condições onde DraG está ativa), DraG encontra-se predominantemente no citoplasma. No tempo 5 minutos após o choque de amônio, condição onde NifH está completamente modificada (condição onde DraG está inativa), DraG está predominantemente associada à fração de membrana. Como a proteína NifH só está presente na fração de citoplasma (Figura 35G), é possível que a ligação da enzima DraG à membrana afete sua atividade apenas pela simples separação física do seu substrato, a proteína NifH ADP-ribosilada.

5.11 Localização celular da enzima DraG na ausência das proteínas AmtB, GlnB e GlnZ

O que leva a enzima DraG a se associar à membrana citoplasmática após o choque de amônio? A ligação à membrana das proteínas GlnB, GlnZ e DraG é claramente sincronizada (Figuras 44E, 44F e 44H) sugerindo que a ligação de DraG à membrana possa ser mediada pelas proteínas GlnB e GlnZ através de interações proteína-proteína. Como o canal para amônia AmtB é necessário para a associação à membrana das proteínas GlnB e GlnZ, foi verificado se a ligação de DraG também seria dependente de AmtB. Nenhum sinal para DraG foi observado na fração de membrana após a adição de amônio na estirpe FAJ310(*amtB::km*) (Figura 45A), enquanto que o padrão de distribuição da proteína DraT foi idêntico ao observado na Figura 44G (dados não mostrados). A dependência da proteína AmtB para a ligação de DraG à membrana após o choque de amônio é consistente com a ausência de modificação da proteína NifH no mutante *amtB* (Figura 42A). Neste mutante a enzima DraG permaneceria no citoplasma impedindo sua inativação após a adição de amônio às células.

A dependência das proteínas GlnB e GlnZ na associação das enzimas DraT e DraG com a membrana foi analisada utilizando os mutantes LFH3 (*glnB*) e 7611 (*glnZ*). O padrão de distribuição celular de DraT nos mutantes *glnB* e *glnZ* foi idêntico ao mostrado na Figura 44G (dados não mostrados). Não foi detectada associação de DraG à fração de membrana em nenhum dos mutantes após a adição de amônio ao meio (Figuras 45B e 45C).

Figura 45 – A ligação de DraG à membrana requer AmtB, GlnB e GlnZ.

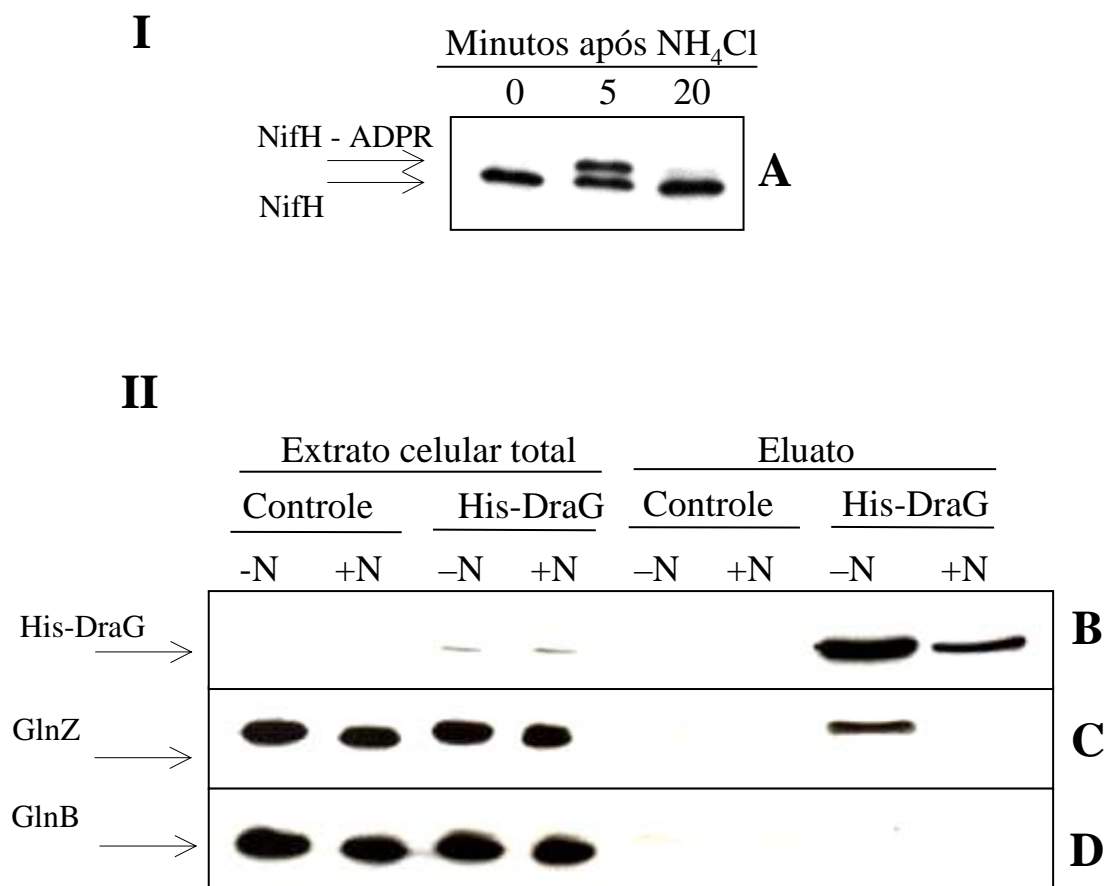


Células de *A. brasilense* FAJ310 (*amtB::km*) (A), LFH3 (mutante *glnB* não-polar) (B) ou 7611 (*glnZ::Ω*) (C) contendo o plasmídeo pLHThisGMP, expressando a enzima nitrogenase, foram submetidas a um choque de amônio (NH_4Cl 200 μM) no tempo zero. As amostras foram coletadas, processadas em frações de citoplasma e membrana e analisadas por “western blot” nos tempos indicados usando anticorpo para DraG.

5.12 Interação da enzima DraG com as proteínas P_{II}

Possíveis interações entre as proteínas GlnB ou GlnZ com a enzima DraG foram determinadas por experimentos de “pull – down”. Células de *A. brasilense* UB4 (*draG::km*) (controle negativo) e UB4 contendo o plasmídeo pLHdraGhisMP (expressa His-DraG) desreprimidas para nitrogenase foram coletadas antes ou 5 minutos depois da adição de NH_4Cl 200 μM . As células foram imediatamente resfriadas em nitrogênio líquido e extratos celulares obtidos. Para evitar a potencial titulação de reguladores de DraG, o promotor *ptac* não foi induzido durante os experimentos. Sob estas condições, a regulação pós-traducional da proteína NifH foi semelhante à observada na estirpe selvagem (Figura 46A).

Figura 46 – Co-eluição das proteínas His-DraG e GlnZ na estirpe UB4 (pLHGhisMP)



Painel I - Células de *A. brasilense* UB4(pLHGhisMP) expressando His-DraG foram submetidas a um choque de amônio (NH_4Cl 200 μM) no tempo zero. As amostras foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para NifH (A). NifH-ADPR indica a proteína ADP-ribosilada. Painel II - Células *A. brasilense* UB4 (*draG::km*) (controle) e UB4(pLHGhisMP) expressando His-DraG, foram coletadas antes (-N) ou 5 minutos depois (+N) da adição de NH_4Cl 200 μM . Extratos celulares totais foram incubados com His MagTM agarose beads por 10 minutos, os “beads” foram lavados extensivamente e as proteínas adsorvidas foram eluídas com imidazol 500mM. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para DraG (B), GlnZ (C) ou GlnB (D).

Os extratos celulares foram incubados com “beads” de agarose His-MagTM. Os “beads” foram lavados extensivamente e as proteínas ligadas foram eluídas com

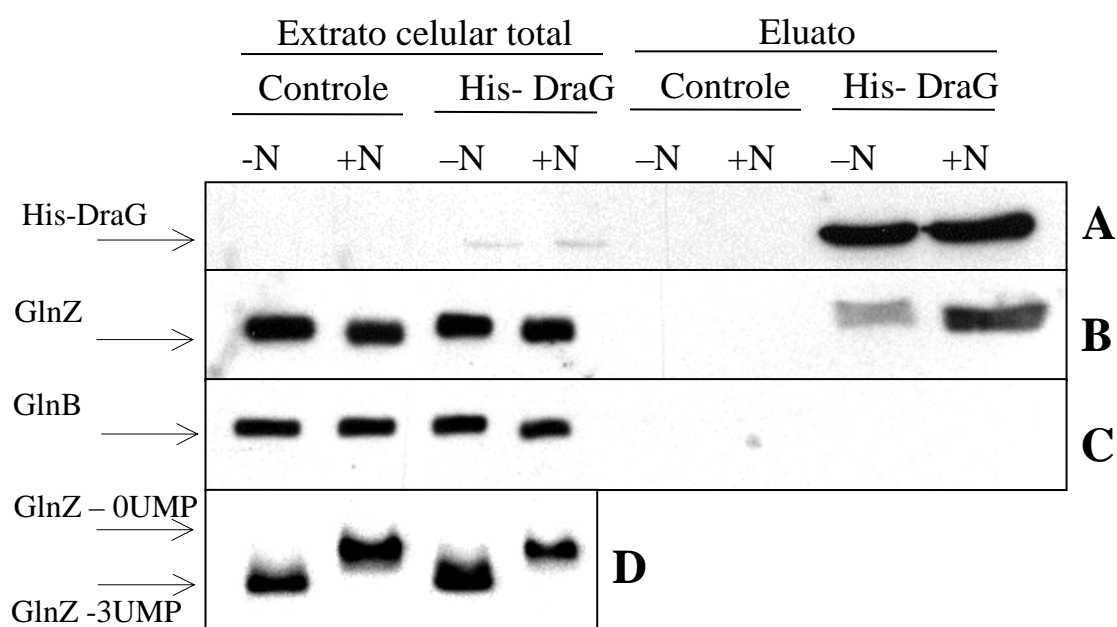
tampão contendo imidazol 500 mM. A presença das proteínas DraG, GlnZ e GlnB no extrato original e no eluato foi analisada por “western blot” usando anticorpos específicos. Como esperado, o sinal para a proteína His-DraG só estava presente na eluato do extrato de células contendo o plasmídeo que expressa a His-DraG (Figura 46B). A proteína GlnZ foi detectada no eluato do extrato de células que expressam a proteína His-DraG, mas apenas quando as células foram coletadas antes do choque de amônio (Figura 46C). Nenhum sinal para a proteína GlnB foi detectado nas frações de eluição (Figura 46D) sugerindo que DraG não interage com GlnB *in vivo*.

Os resultados apresentados na Figura 46B indicam que o sinal da proteína DraG reduziu drasticamente no eluato quando as células foram coletadas depois do choque de amônio (comparar eluato, His-DraG –N e +N). Este fenômeno foi reproduzido em outros experimentos independentes. A proteína DraG é seqüestrada para a fração de membrana de forma dependente de AmtB após a adição de amônio às células (item 5.10). A proteína His-DraG apresentou o mesmo comportamento, sendo quase que totalmente seqüestrada para a fração de membrana 5 minutos após a adição de amônio 200 μ M (dados não mostrados). Uma possível explicação para a redução no sinal para a His-DraG no eluato após a adição de amônio as células (Figura 46B) seria de que a forma His-DraG ligada à fração de membrana é, de alguma forma, menos acessível à ligação com os “beads” His-MagTM.

Com a finalidade de impedir a ligação da proteína His-DraG à membrana e, conseqüentemente, aumentar a quantidade de His-DraG disponível para ligação aos “beads” após a adição de amônio às células, o mesmo experimento descrito anteriormente foi repetido utilizando uma estirpe mutante *amtB*. Para este experimento foi utilizada a estirpe *A. brasilense* FAJ310(*amtB::km*) como controle negativo, e a estirpe FAJ310 contendo o plasmídeo pLHdraGhisMP. Na estirpe mutante *amtB*, o sinal para His-DraG no eluato foi semelhante nas duas condições (Figura 47A, comparar eluato, His-DraG –N e +N). Novamente, nenhum sinal para a proteína GlnB foi observado no eluato (Figura 47C). A presença da proteína GlnZ foi detectada no eluato dos extratos contendo a proteína His-DraG quando as células foram coletadas antes ou depois do choque de amônio (Figura 47B), indicando que a proteína DraG interage com a proteína GlnZ *in vivo* e que a interação não é regulada pelos níveis de nitrogênio na célula. A análise do estado de uridililação da

proteína GlnZ nos extratos celulares indica que a proteína GlnZ estava totalmente uridililada quando as células foram coletadas em condições de fixação de nitrogênio, e totalmente desuridililada após o choque de amônio (Figura 47D), sugerindo que DraG interage com GlnZ independentemente do estado de uridililação de GlnZ. Entretanto, o sinal referente a GlnZ no eluato foi 3X mais intenso após a adição de amônio (comparar Figura 47B eluato His-DraG, -N e +N), indicando que interação entre DraG e GlnZ é maximizada quando GlnZ está totalmente desuridililada.

Figura 47 – Co-eluição das proteínas His-DraG e GlnZ na estirpe FAJ310 (pLHGHisMP)



Células de *A. brasilense* FAJ310 (*amtB::km*) (controle) e FAJ310(pLHGHisMP) expressando a proteína His-DraG foram coletadas antes (-N) ou 5 minutos depois (+N) da adição de NH_4Cl 200 μM . Extratos celulares totais foram incubados com His MagTM agarose beads, os “beads” foram lavados extensivamente e as proteínas adsorvidas foram eluídas com imidazol 500 mM. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para DraG (A), GlnZ (B) e GlnB (C). Extratos celulares totais foram analisados por native-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GlnZ (D). GlnZ-0UMP e GlnZ-3UMP indica a proteína desuridililada e uridililada, respectivamente.

5.13 Interação da enzima DraT com as proteínas P_{II}

Para investigar possíveis interações entre DraT e GlnB e/ou GlnZ, foram preparados extratos celulares de células fixando nitrogênio. As células foram

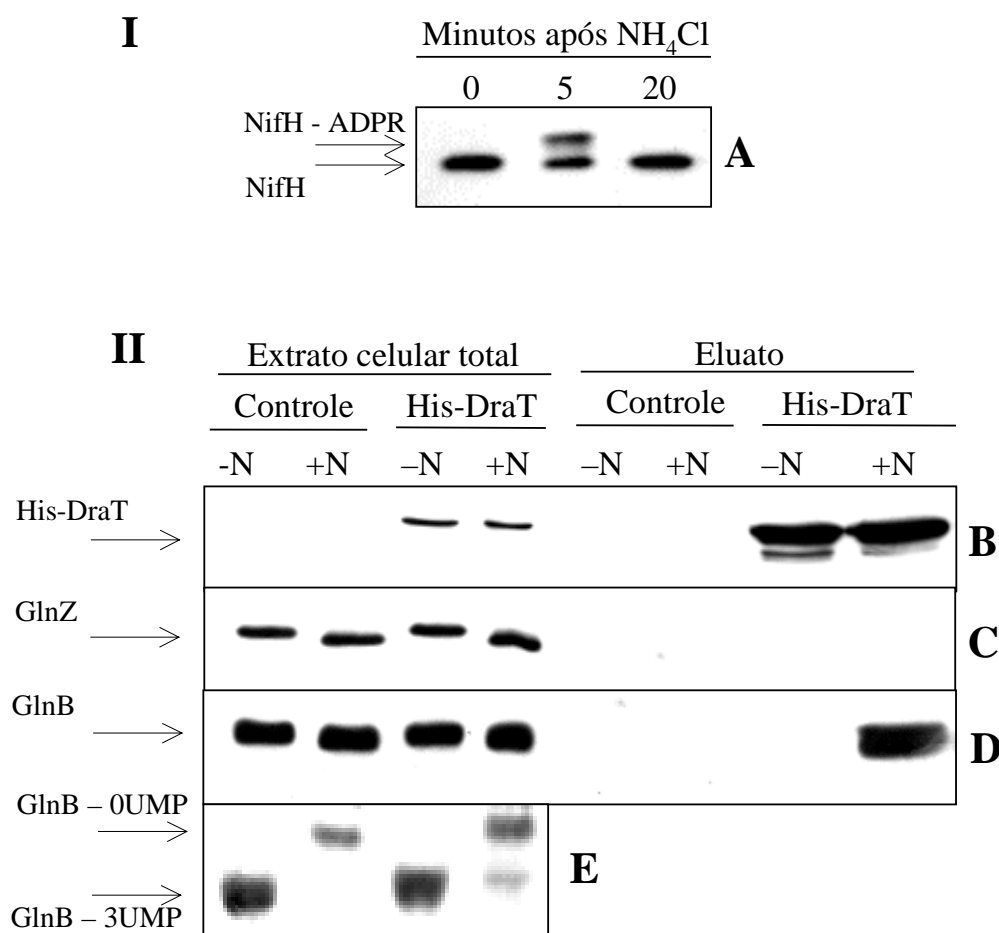
coletadas antes ou 5 minutos depois da adição de NH_4Cl 200 μM . As estirpes usadas foram *A. brasilense* UB2 (*draT::km*) como controle negativo, e UB2 contendo o plasmídeo pLHdraThisGMP, que expressa His-DraT e DraG nativa sob controle do promotor *ptac*. Para evitar a potencial titulação de reguladores de DraG o promotor *ptac* não foi induzido durante os experimentos. Sob estas condições, a regulação pós-traducional da proteína NifH foi semelhante à observada na estirpe selvagem (Figura 48A).

Os extratos celulares foram incubados com “beads” de agarose His-MagTM, os “beads” foram lavados extensivamente e as proteínas ligadas foram eluídas com tampão contendo imidazol 500 mM. A presença das proteínas DraT, GlnZ e GlnB no extrato original e no eluato foi analisada por “western blot” usando anticorpos específicos. Como esperado, o sinal para a proteína His-DraT só estava presente na elução do extrato de células contendo o plasmídeo que expressa a His-DraT (Figura 48B). Nenhum sinal para a proteína GlnZ foi detectado nas frações de eluição (Figura 48C) sugerindo que a proteína DraT não interage com GlnZ *in vivo*. A proteína GlnB foi detectada no eluato do extrato de células que expressam a proteína His-DraT, mas apenas quando as células foram coletadas após o choque de amônio (Figura 48D).

A análise do estado de uridililação da proteína GlnB nos extratos celulares indica que a proteína GlnB estava totalmente uridililada quando as células foram coletadas em condições de fixação de nitrogênio, e quase totalmente desuridililada após o choque de amônio (Figura 48E), sugerindo que DraT interage apenas com a forma desuridililada da proteína GlnB *in vivo*.

Um trabalho anterior levantou a hipótese de que a proteína DraT poderia interagir fisicamente com DraG em *R. rubrum* (GRUNWALD *et al.*, 1995). Não foi detectado nenhum sinal para DraG no eluato de células expressando a proteína His-DraT (dados não mostrados), indicando que DraT não interage com DraG em *A. brasilense*. Entretanto, é possível que tal interação ocorra *in vivo* mas seja perdida durante o processamento da amostra.

Figura 48 – DraT interage com a forma desuridililada de GlnB *in vivo*.



Painel I - Células de *A. brasilense* UB2(pLHThisGMP) expressando His-DraT foram submetidas a um choque de amônio (NH₄Cl 200μM) no tempo zero. As amostras foram coletadas nos tempos indicados e analisadas por SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para NifH (A). NifH-ADPR indica a proteína NifH ADP-ribosilada. Painel II – Células de *A. brasilense* UB2 (*draT::km*) (controle) e UB2(pLHThisGMP) expressando His-DraT, foram coletadas antes (-N) ou 5 minutos depois (+N) da adição de NH₄Cl 200 μM. Extratos celulares totais foram incubados com His MagTM agarose beads, os “beads” foram lavados extensivamente e as proteínas adsorvidas foram eluídas com imidazol 500mM. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para DraT (B), GlnZ (C) ou GlnB (D). Extratos celulares totais foram analisados por native-PAGE seguido de “western blot” usando anticorpo para GlnB (E). GlnB-0UMP e GlnB-3UMP indicam a proteína desuridilada e uridilada, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

6.1 Papel da proteína NtrC na expressão do gene *glnB* de *A. brasilense*

Estudos com fusões traducionais *glnB-lacZ* em mutantes *ntrB* e *ntrC* indicavam que a proteína NtrC não estaria envolvida na regulação dos promotores *glnB* em *A. brasilense* (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Entretanto, outros resultados sugeriam que a proteína NtrC regula diretamente a expressão de *glnB* (HUERGO, 2002). Para confirmar a participação da proteína NtrC na regulação da expressão de *glnB* foram obtidos dois mutantes insercionais *ntrC::km*. Utilizando fusões traducionais e transcricionais *glnB-lacZ*, a expressão de *glnB* foi monitorada nestes mutantes e na estirpe selvagem na presença ou ausência de amônio. A expressão do gene *glnB* foi aumentada cerca de 8X em resposta à limitação de nitrogênio na estirpe selvagem (Tabela 7), confirmando dados anteriores (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Porém, ao contrário do observado por DE ZAMAROCZY e colaboradores (1993), a expressão do gene *glnB* foi alterada nas estirpes *ntrC* em relação à estirpe selvagem FP2 (Tabela 7). A atividade do promotor *glnB* permaneceu em um nível relativamente alto e perdeu a regulação por amônio na ausência de NtrC. Fusões *glnB-lacZ* nas quais o promotor *glnBp2* - σ^N foi mutagenizado (-24 GG/AA) foram obtidas. A expressão do promotor *glnBp2* - σ^N mutagenizado foi muito similar à expressão do promotor selvagem na estirpe LHNTTC3 (*ntrC*) (Figura 17), indicando que a expressão de *glnB* observada no mutante *ntrC* ocorre apenas a partir do promotor *glnBp1* - σ^{70} .

Os dados obtidos levaram à conclusão que a proteína NtrC regula a expressão dos promotores *glnB* ativando o promotor σ^N - *glnBp2* e reprimindo o promotor σ^{70} - *glnBp1* uma vez que este se sobrepõe a dois possíveis sítios para ligação de NtrC (Figura 20). Este mesmo tipo de regulação foi observada na região promotora do gene *glnB* em *R. capsulatus* e *B. japonicum* (FOSTER-HARTNETT e KRANZ, 1994; MARTIN *et al.*, 1989) e do operon *glnAntrBC* em *E. coli* (DIXON, 1984), além disso, a proteína NtrC participa na regulação da expressão de *glnB* em todos os membros das α -proteobactérias já estudados.

Outros dados fisiológicos observados em mutantes *ntrC* de *A. brasilense* estão de acordo com o modelo proposto de regulação para a expressão de *glnB*. A atividade total da glutamina sintetase (GS) em mutantes *ntrC* é cerca de 40% da observada na estirpe selvagem em condições limitantes de nitrogênio (ZHANG *et al.*,

1994; ISHIDA, 2002). A GS é expressa predominantemente a partir dos promotores *glnB* em condições de limitação de nitrogênio (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990), sendo assim, a redução da GS total deve estar diretamente relacionada com a redução na expressão de *glnB* observada nos mutantes *ntrC* nestas condições (redução de aproximadamente 50%, Tabela 7, comparar estirpe selvagem com mutantes *ntrC*, fusões *glnB-lacZ* condição $-NH_4$).

6.2 Determinação das bases moleculares para o fenótipo das estirpes FP8 e FP9 de *A. brasilense*

O estudo da regulação da fixação de nitrogênio em *A. brasilense* foi iniciado com o isolamento de mutantes incapazes de fixar nitrogênio (Nif^-). PEDROSA e YATES (1984) isolaram dois mutantes químicos (FP8 e FP9) os quais apresentaram deficiência de crescimento em nitrato e fenótipo Nif^- . Estes fenótipos foram complementados com o gene *ntrC* de *K. pneumoniae*, sugerindo que a mutação nas estirpes FP8 e FP9 ocorrera no gene *ntrC*. Entretanto, mutantes *ntrC* insercionais obtidos por LIANG *et al* (1993) e MACHADO *et al.* (1995) são capazes de fixar de nitrogênio. O fenótipo Nif^- no mutante FP9 é decorrente da baixa expressão de *glnB* (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993).

Com a finalidade de esclarecer as bases moleculares para o fenótipo apresentado pela FP8 e FP9 o gene *ntrC* da estirpe FP9 (FP9-*ntrC*) foi isolado, clonado e seqüenciado. Os fenótipos observados após a introdução do gene FP9-*ntrC* nas estirpes FP2 (selvagem) e LHNTRC5 (*ntrC*) indica que o produto do gene *ntrC* da estirpe FP9 é a causa do fenótipo Nif^- e Nar^- neste mutante, excluindo a possibilidade de que os fenótipos observados na estirpe FP9 sejam ocasionados por múltiplas mutações em diferentes pontos do genoma. O sequenciamento do gene *ntrC* das estirpes FP9 e FP8 revelou a presença de uma única troca de base em cada estirpe em relação ao *ntrC* selvagem. A seqüência de aminoácidos deduzida indica substituições das glicinas 238 e 240 no sítio para ligação de ATP (Walker A) das proteínas FP8-NtrC e FP9-NtrC, respectivamente (Figura 22). Mutações no motivo Walker A na proteína NtrC de *S. typhimurium* geram proteínas com característica repressora NtrC(rep), ou seja, são capazes de se ligar a sítios UAS no DNA mas não tem capacidade de ativar transcrição de genes dependentes de σ^N -RNA polimerase (WEISS *et al.*, 1991). A capacidade da proteína FP9-NtrC de se

ligar ao DNA foi confirmada pela redução na expressão do operon *nifR3ntrBC* observada na presença de FP9-NtrC (Tabela 8) e a incapacidade de ativar transcrição foi verificada pela incapacidade de complementar o fenótipo Nar^- do mutante LHNTRC5 (*ntrC*) (Figura 18). Estes dados indicam que as estirpes FP8 e FP9 codificam para formas NtrC(rep).

A presença de formas NtrC(rep) explica o fenótipo Nif^- observados nas estirpes FP8 e FP9. As proteínas FP8-NtrC e FP9-NtrC seriam incapazes de ativar a transcrição do promotor *glnBp2* – σ^N , porém se ligariam aos sítios UAS no DNA, levando assim ao bloqueio do promotor *glnBp1* – σ^{70} (Figura 20). Estes dados corroboram a conclusão de que a proteína NtrC regula a expressão dos promotores *glnB* (item 6.1)

6.3 Efeito da superexpressão de His-DraT, His-DraG e His-DraT + DraG sobre o desligamento-religamento da nitrogenase

A superexpressão de His-DraT e His-DraG resultou em regulação anormal de ambas as enzimas, uma vez que o perfil de modificação da proteína NifH foi alterado em relação à estirpe selvagem (Figura 32). A superexpressão de His-DraT resultou em modificação de NifH mesmo antes da adição de amônio ao meio. Por outro lado, a superexpressão de His-DraG impediu a modificação completa de NifH após a adição de NH_4Cl 1mM. Em células superexpressando as duas enzimas simultaneamente (His-DraT e DraG nativa), a regulação da nitrogenase foi semelhante à observada na estirpe selvagem, porém, a proteína NifH se apresentou parcialmente modificada antes da adição de amônio ao meio (Figura 32, tabela).

O efeito da superexpressão de DraT e DraG sob a regulação da nitrogenase já havia sido estudado em *R. rubrum*. GRUNWALD e colaboradores (1995), construíram plasmídeos capazes de superexpressar DraT e DraG a partir do promotor *nifH*. Ao contrário do observado em *A. brasilense*, nenhuma modificação de NifH foi observada antes da adição do estímulo negativo em células superexpressando DraT. Uma possível explicação para esta diferença seria de que os níveis de expressão de DraT em *A. brasilense* foram maiores do que em *R. rubrum*, com isso, um possível regulador negativo (ou atividade de DraG) não seria capaz de bloquear o excesso de DraT. A superexpressão de DraG em *R. rubrum* resultou em ausência total de ADP-ribosilação de NifH em resposta a adição de

amônio ao meio, este resultado é similar aos dados deste trabalho, porém, uma modificação parcial de NifH foi observada em *A. brasilense* (Figura 32).

A superexpressão simultânea de ambas as enzimas DraT e DraG em *A. brasilense* restaura a regulação normal da nitrogenase, o mesmo ocorre em *R. rubrum*. Foi sugerido que um balanço de concentração de DraT e DraG seria necessário para a regulação da atividade destas enzimas possivelmente devido a interações diretas entre DraT e DraG em *R. rubrum* (GRUNWALD *et al.*, 1995). Outra possível explicação seria que as enzimas DraT e DraG superexpressas são parcialmente reguladas, criando um ciclo fútil de modificação de NifH e gerando um fenótipo selvagem de desligamento/religamento da nitrogenase. Várias evidências favorecem a segunda hipótese em *A. brasilense*: (1) *A. brasilense* superexpressando DraT apresenta ADP-ribosilação apenas parcial de NifH, sugerindo que DraT está ativa antes da adição de amônio. Se a superexpressão de DraT inibisse diretamente a atividade de DraG, NifH deveria estar totalmente modificada. (2) *A. brasilense* superexpressando DraG apresentou ADP-ribosilação parcial da nitrogenase após adição de amônio as células, sugerindo que DraT está sendo normalmente regulada nestas condições, se a superexpressão de DraG inibisse DraT, o processo de ADP-ribosilação de NifH seria totalmente interrompido. (3) Modificação parcial da NifH foi observada em células superexpressando DraT e DraG antes da adição de amônio. A hipótese proposta é que ambas as enzimas estariam ativas antes da adição de amônio ocasionando um ciclo fútil de modificação de NifH. A modificação parcial observada provavelmente se deve ao fato de que DraT deve estar sendo expressa em níveis mais elevados que DraG uma vez que DraT está sob controle do sítio forte de início de tradução do vetor pET28a, ao passo que DraG está sob controle do próprio sítio de início de tradução. (4) Interações entre DraT e DraG não foram observadas em experimentos de co-precipitação (item 5.13).

O fato da superexpressão de DraG resultar em desligamento parcial da nitrogenase sugere a titulação de um regulador negativo nestas condições, possivelmente da proteína GlnZ, uma vez que a proteína GlnZ foi sugerida como regulador de DraG (KLASSEN *et al.*, 2001). A superexpressão de DraT resulta em ADP-ribosilação parcial constitutiva de NifH sugerindo também a titulação de um regulador negativo.

6.4 Papel das proteínas GlnB, GlnZ e AmtB na regulação de DraT e DraG

Apesar de vários trabalhos anteriores terem concluído que as proteínas da família P_{II} e AmtB estão envolvidas na regulação de DraT e DraG em diversos organismos, até então não havia nenhum estudo indicando como tal regulação poderia ocorrer. Com a finalidade de esclarecer este ponto, foram estabelecidas as condições experimentais para acessar os ciclos de modificação pós-traducional das proteínas NifH, GS, GlnB e GlnZ em *A. brasilense* em resposta a um choque de amônio. Os resultados aqui descritos mostram que a modificação pós-traducional destas proteínas e a ligação de GlnB e GlnZ à membrana estão sincronizados (Figura 35). Mutantes cromossomais *glnB* e *glnZ* de *A. brasilense* apresentaram uma modificação pós-traducional da proteína NifH, em resposta a amônio, diferente da observada na estirpe selvagem, porém, outras respostas induzidas por amônio como a adenililação da enzima GS e a ligação à membrana da proteína da família P_{II} também foi drasticamente alterada (Figuras 38 e 40). Devido aos efeitos pleiotrópicos apresentados pelos mutantes *glnB* e *glnZ* fica impossível distinguir se a alteração no perfil de modificação da proteína NifH é decorrente de efeitos diretos ou indiretos da ausência das proteínas P_{II}.

Como previamente reportado em *R. capsulatus* e *Azoarcus* sp., foi concluído que a proteína AmtB também é necessária para a modificação da proteína NifH induzida por amônio em *A. brasilense* (Figura 42). A ausência da proteína AmtB não alterou o perfil de modificação das proteínas GS, GlnB e GlnZ indicando que, nas condições experimentais utilizadas, a captação de amônio não é significativamente alterada na ausência da proteína AmtB (Figura 42). Em *E. coli* a atividade da proteína AmtB somente é necessária quando a concentração de amônio no meio externo é menor do que 50 µM, além disso, em concentrações mais elevadas de amônio, a atividade da proteína AmtB é inibida pela formação do complexo AmtB-GlnK (JAVELLE *et al.*, 2004). Sendo assim, é bem provável que, nas condições utilizadas neste trabalho (choque de amônio 200µM em *A. brasilense*), o amônio entre nas células por vias de transporte alternativas, como por exemplo, simples difusão através da membrana.

Quando o mutante *amtB* foi submetido a um forte choque de amônio (NH₄Cl 20 mM), bandas fracas referentes à proteína NifH-ADP-ribosilada puderam ser observadas (Figura 43). Este resultado sugere que na ausência da proteína AmtB,

DraT está sendo normalmente ativada em resposta a amônio e que a modificação parcial da proteína NifH observada seja resultado da incapacidade de desligar DraG após o choque de amônio, levando a um ciclo fútil de ADP-ribosilação da proteína NifH. Esta hipótese está de acordo com dados já publicados, a ausência do ativador transcricional NtrC impede a modificação da proteína NifH após a adição de amônio (ZHANG *et al.*, 1994). Como a expressão do gene *amtB* depende da proteína NtrC (VAN DOMMELEN *et al.*, 1998), é bem provável que o fenótipo do mutante *ntrC* seja devido à ausência da proteína AmtB. É importante notar que no mutante *ntrC* DraG não está sujeita a regulação, uma vez que um duplo mutante *ntrC draG* é capaz de modificar NifH em resposta a adição de amônio, indicando que DraT é normalmente regulada (ZHANG *et al.*, 1994).

Os resultados descritos neste trabalho mostram claramente que as proteínas GlnB, GlnZ e DraG associam-se reversivelmente e de forma AmtB-dependente com a fração de membrana após a adição de amônio às células (Figuras 35 e 41). A dependência da proteína AmtB na associação de DraG à membrana após o choque de amônio poderia ocorrer por interação direta entre AmtB e DraG. Alternativamente, DraG poderia se ligar à proteína AmtB de forma indireta devido a interações com as proteínas da família P_{II}, GlnB e/ou GlnZ, em um complexo de 3 proteínas. Os resultados obtidos mostraram que a ligação de DraG à membrana só ocorre na presença de GlnB ou GlnZ (Figura 45). Estas observações permitem sugerir que a proteína AmtB esteja funcionando como ponto de ancoragem para o complexo DraG-P_{II} na membrana citoplasmática.

Devido aos vários efeitos pleiotrópicos apresentados pelos mutantes *glnB* e *glnZ* é impossível distinguir se o diferente padrão de modificação de NifH e ligação de DraG à membrana (Figuras 38 e 40), seja causado por efeitos diretos ou indiretos das respectivas mutações. Além disso, os ensaios empregados não permitem distinguir se os fenótipos observados refletem alterações na atividade de DraT, DraG ou ambas.

As proteínas da família P_{II} tipicamente regulam a atividades de outras proteínas através de interações proteína-proteína. Sendo assim, foi investigada a formação de possíveis complexos entre as proteínas P_{II} (GlnB e GlnZ) com as enzimas DraT e DraG. A formação de tais complexos foi verificada através da

técnica de co-precipitação (“pull-down”) utilizando-se versões das enzimas DraT e DraG com uma cauda de 6 histidinas na região N-terminal (His-DraT e His-DraG).

Os resultados obtidos indicam que a enzima DraG liga-se especificamente à proteína GlnZ *in vivo* e que a formação do complexo independe do estado de uridililação de GlnZ (Figura 47). Este resultado sugere que a ligação de DraG à membrana de forma dependente da proteína AmtB seja mediada pela proteína GlnZ devido à formação de um complexo ternário DraG/GlnZ/AmtB. Este é o primeiro trabalho que indica que uma proteína da família Amt pode não só mediar a associação de uma proteína da família P_{II} à fração de membrana, mas também formar complexos ternários envolvendo proteínas P_{II} e seus alvos, neste caso DraG.

Os fenótipos apresentados pelos mutantes *glnB* e *glnZ* foram diferentes, a proteína GlnZ não é desuridililada e não se associa à fração de membrana no mutante *glnB*, porém, a proteína GlnB é desuridililada e se associa à fração de membrana no mutante *glnZ* (Figuras 38 e 40). Estes dados direcionam para a formação de um modelo no qual a forma desuridililada da proteína GlnZ seria necessária para a ligação de DraG à membrana, por interação entre a forma desuridililada de GlnZ e DraG. Este modelo é consistente com a ausência de modificação da proteína NifH no mutante *glnB* (Figura 38), uma vez que DraG permaneceria no citoplasma e ficaria ativa após o choque de amônio. Na ausência de GlnZ, a forma desuridililada da proteína GlnB poderia ser capaz carrear DraG para a membrana após a adição de amônio. Esta interação ocorreria somente na ausência de GlnZ, sendo a interação GlnB-DraG mais fraca e mais susceptível a dissociação durante a preparação das frações celulares. Este modelo explica a modificação da proteína NifH observada no mutante *glnZ*, onde DraG se ligaria à membrana após o choque de amônio, porém, devido à menor afinidade do complexo GlnB-DraG, DraG não seria detectada na fração de membrana no mutante *glnZ* (Figura 45). De fato, interações entre DraG-GlnB foram observadas em experimentos de “pull-down” apenas quando a proteína DraG é superexpressa (dados não mostrados), indicando que tais interações são fracas. Esta situação é comparável a interações entre as proteínas P_{II}, GlnK e GlnB, com AmtB em *E. coli*. Neste caso, a proteína GlnK liga-se à fração de membrana de forma dependente de AmtB em resposta a um choque de amônio, entretanto, GlnB, a qual tem menor

afinidade por AmtB, pode ser encontrada na fração de membrana quando GlnK está ausente (JAVELLE *et al.*, 2004; A. DURAND, comunicação pessoal).

Os resultados descritos até então, sugerem que a enzima DraG seja regulada negativamente, de acordo com os níveis de amônio extracelular, pela ligação à membrana de forma dependente de GlnZ e AmtB. Estudos recentes em *R. rubrum* indicam que a enzima DraG se liga à fração de membrana de forma dependente das proteínas GlnJ e AmtB, estes autores também propõe que DraG seja negativamente regulada através da interação com a membrana (WANG *et al.*, 2005).

Mudanças na localização celular de proteínas foram recentemente descritas como um mecanismo importante no controle de diversos processos metabólicos em bactérias (SHAPIRO e LOSICK, 2000). A proteína PutA repressora de transcrição do operon de utilização de prolina em *S. typhimurium* (*put*), encontra-se ligada à membrana de acordo com a concentração de prolina intracelular (MURO-PASTOR *et al.*, 1997). Em *E. coli*, na presença de glucose, a proteína repressora Mlc liga-se ao transportador de glucose PtsG permitindo a desrepressão dos promotores regulados por Mlc (TANAKA *et al.*, 2000). Em *K. pneumoniae*, a proteína repressora da transcrição dos genes *nif*, NifL está associada à membrana sob condições de fixação de nitrogênio permitindo a atividade da proteína NifA. Quando as condições se tornam desfavoráveis para a fixação de nitrogênio, NifL retorna para o citoplasma inibindo a atividade de NifA (KLOPPROGGE *et al.*, 2002).

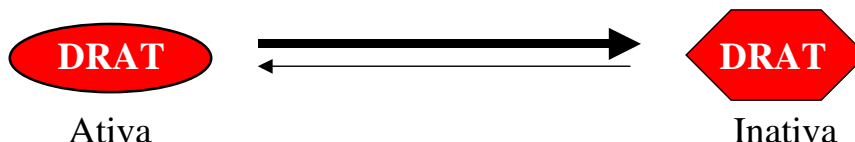
Uma outra questão seria como a enzima DraT é ativada com o aumento nos níveis de amônio no meio externo. A enzima DraT interage com a proteína GlnB *in vivo* apenas quando as células são submetidas a um choque de amônio (Figura 48). Nestas condições, a proteína GlnB está quase que completamente desuridililada, sugerindo que em *A. brasilense* o estado de uridililação de GlnB controla a formação do complexo GlnB/DraT. É importante notar que tal complexo só é formado quando os níveis de amônio no meio externo aumentam, condição em que DraT é ativada. Sendo assim, é bem provável que a formação do complexo GlnB/DraT resulte na ativação de DraT. Esta hipótese é corroborada por estudos genéticos os quais indicam que a proteína GlnB é necessária para a ADP-ribosilação da proteína NifH induzida por amônio em *A. brasilense* (KLASSEN *et al.*, 2005) (Figura 38A). Além disso, quando a proteína GlnB é superexpressa, e conseqüentemente não é uridililada devido à titulação da enzima uridililtransferase (GlnD), NifH encontra-se

parcialmente modificada mesmo em condições de limitação de nitrogênio (HUERGO *et al.*, 2005). Estas observações em *A. brasilense* são consistentes com trabalhos em outros organismos. Em *R. rubrum*, a expressão de uma forma de GlnB constitutivamente desuridililada (GlnB Y51F) leva a modificação completa de NifH em condições de fixação de nitrogênio quando DraG não está presente (ZHANG *et al.*, 2000). Em *R. capsulatus* e *R. rubrum*, DraT interage com GlnB em um sistema de dois híbridos de levedura (PAWLOSKI *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2006).

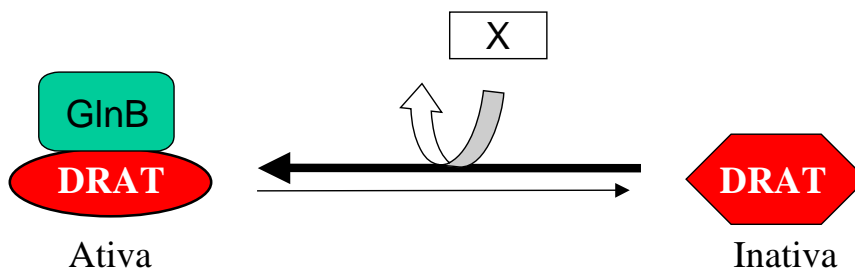
A enzima DraT está sempre ativa quando purificada, o que sugere a presença de um regulador negativo. Os dados deste trabalho confirmam esta hipótese uma vez que DraT encontra-se constitutivamente ativa quando superexpressa (item 5.4.2). Por outro lado, os dados discutidos no parágrafo anterior indicam que DraT seria regulada positivamente por interação com GlnB desuridililada. O seguinte modelo poderia integrar as diferentes linhas (Figura 49). É possível que DraT co-exista em duas conformações distintas, uma ativa e outra inativa. Sob condições de fixação de nitrogênio o equilíbrio estaria direcionado para a forma inativa; após a adição de amônio, a proteína GlnB desuridililada deslocaria o equilíbrio para a forma ativa (Figura 49). Se este modelo for correto, a superexpressão de DraT certamente aumentaria a fração da enzima ativa levando a modificação parcial de NifH antes da adição de amônio. A atividade de DraT poderia ser detectada com a enzima purificada, como observado. Os seguintes dados suportam a hipótese de que uma pequena fração de DraT encontra-se ativa em condições de fixação de nitrogênio: 1) A atividade inicial da nitrogenase no mutante *draG* é cerca de 50% menor que a observada na estirpe selvagem (ZHANG *et al.*, 1992); 2) A estirpe *draG* apresenta bandas bem fracas de NifH-ADP-ribosilada antes da adição de amônio (ZHANG *et al.*, 1993).

Figura 49 – Modelo proposto para o controle da atividade de DraT

A) Condições de fixação de nitrogênio



B) Adição do estímulo negativo



De acordo com o modelo, DraT estaria em equilíbrio em duas conformações distintas, uma ativa e outra inativa. Em condições de fixação de nitrogênio (A) o equilíbrio estaria direcionado para a forma inativa. (B) após a adição de amônio, a proteína GlnB desuridililada se ligaria à enzima DraT favorecendo a conformações ativa. Um fator desconhecido (X) poderia também deslocar o equilíbrio de DraT para a conformação ativa em resposta a anaerobiose.

A enzima DraT foi encontrada parcialmente associada à membrana, este padrão não foi alterado após a adição de amônio (Figura 44G) e na ausência de GlnB, GlnZ e AmtB (dados não mostrados), sugerindo que a ligação à membrana não exerça um papel fisiológico. É possível que a presença da cauda de histidinas tenha alterado a solubilidade da enzima DraT fazendo com que His-DraT seja encontrada associada à membrana. De fato, os resultados descritos no item 5.4.1, indicam que His-DraT é bastante insolúvel quando expressa em *E. coli*.

Os resultados apresentados indicam que DraT interage fisicamente com a forma desuridililada de GlnB (Figura 48) e que GlnB desuridililada se liga à fração de membrana de forma AmtB dependente (Figura 41). Os dados experimentais indicam que ambas as interações GlnB-DraT e GlnB-AmtB, só ocorrem quando GlnB encontra-se desuridililada. É bem possível que DraT e AmtB se liguem a mesma face da proteína GlnB (provavelmente no loop-T). Sendo assim, a ligação de GlnB a DraT excluiria a ligação de GlnB a AmtB e vice-versa, impedindo a formação de um complexo ternário. Esta hipótese é consistente com a ausência de ligação de DraT a membrana após um choque de amônio.

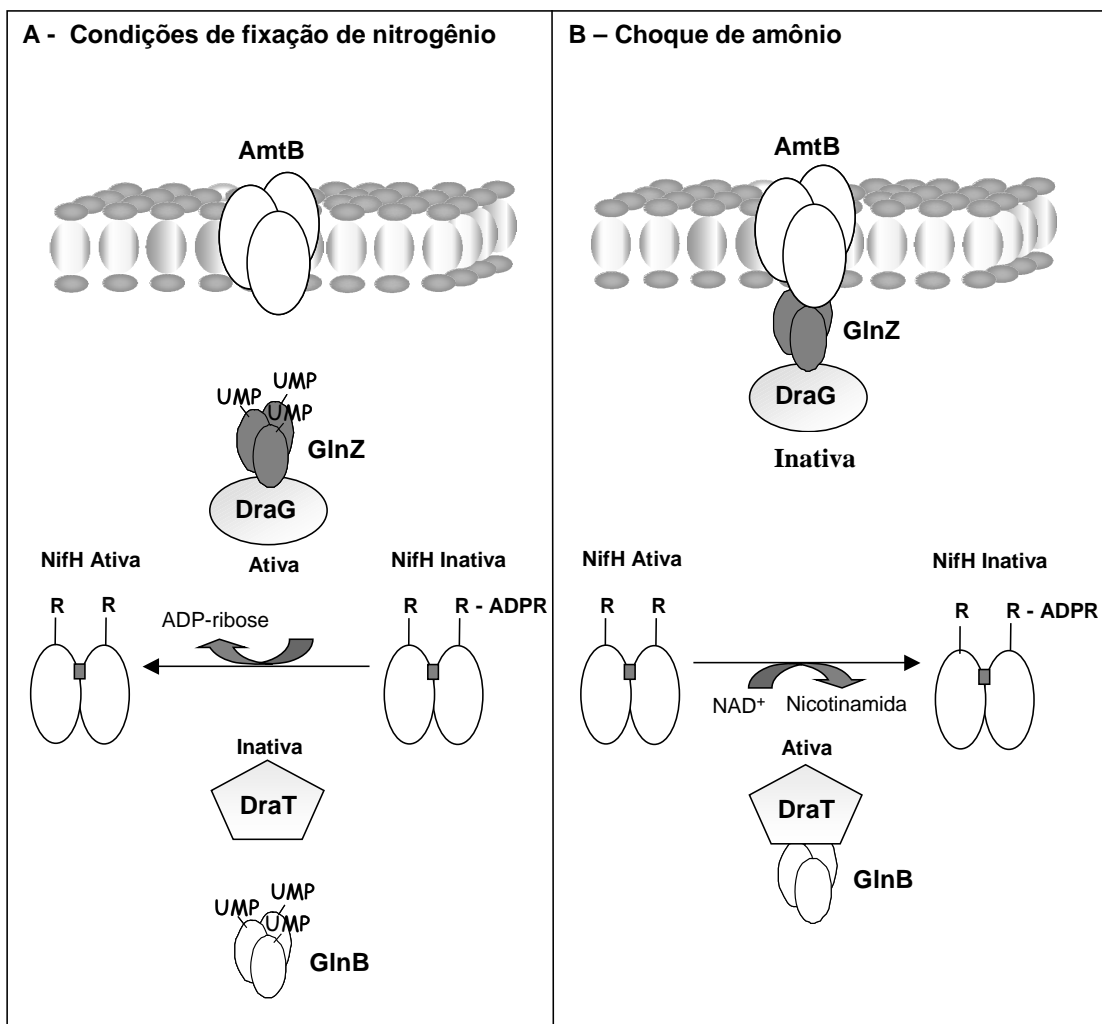
A relevância fisiológica da ligação de uma fração da proteína GlnB à fração de membrana após um choque de amônio (Figura 41) permanece desconhecida. Este evento não tem nenhuma significância aparente para o processo de controle pós-traducional da nitrogenase. Além de DraT, a proteína GlnB possui dois outros alvos conhecidos em *A. brasilense*, NifA e NtrB, mas é bem provável que a proteína GlnB participe no controle de outras proteínas e enzimas em interações ainda não identificadas. Sendo assim, a ligação da proteína GlnB à membrana após um choque de amônio poderia produzir 2 efeitos: 1) Reduzir os níveis de GlnB desuridililada no citoplasma após um choque de amônio. Esta resposta poderia ser importante para o sistema NtrC por exemplo, prevenindo a terminação da transcrição de genes NtrC dependentes em resposta a variações pequenas e transitórias nos níveis de amônio no meio extracelular. 2) Permitir o seqüestro de proteínas complexadas com GlnB desuridililada para a fração de membrana. A ligação de algum alvo da proteína GlnB a fração de membrana poderia atuar como um possível mecanismo regulatório, como exemplificado pelo caso GlnZ/DraG.

Os dados experimentais obtidos durante a realização deste trabalho permitiram a proposição de um modelo que explica o papel das proteínas P_{II} (GlnB e GlnZ) e AmtB na regulação das enzimas DraT e DraG em resposta a flutuações nos níveis de amônio extracelular (Figura 50). Em condições de fixação de nitrogênio, as proteínas P_{II}, GlnB e GlnZ, estão totalmente uridililadas e se localizam no citoplasma. DraG está no citoplasma em um complexo com a forma uridililada de GlnZ. Nestas condições DraG está ativa e DraT está inativa, conseqüentemente NifH não está modificada permitindo atividade da nitrogenase. Quando os níveis de amônio extracelular aumentam, a atividade da enzima GS aumenta os níveis de

glutamina intracelular, causando a desuridililação das proteínas GlnB e GlnZ pela enzima GlnD. A forma desuridililada de GlnB associa-se com a enzima DraT ativando DraT e causando a ADP-ribosilação de NifH e inativando a nitrogenase. Ao mesmo tempo, a desuridililação de GlnZ faz com que o complexo DraG/GlnZ complexo se associe com a proteína de membrana AmtB. A ligação à membrana de DraG separa fisicamente a enzima de seu substrato (a forma ADP-ribosilada de NifH), inibindo o processo de remoção do grupo ADP-ribose. A simples separação física poderia ser suficiente para prevenir que DraG atue sobre NifH-ADP-ribosilada, mas também é possível que a ligação de DraG à membrana cause a inativação de DraG. Componentes similares como DraT, DraG, AmtB e duas ou mais proteínas da família P_{II} estão presentes em vários diazotrofos que exibem controle da nitrogenase por ADP-ribosilação da NifH, é bem possível que o modelo descrito neste trabalho (Figura 50) possa também ser aplicado em tais organismos.

Neste trabalho não foi investigado se DraG também se associa a membrana durante a modificação de NifH induzida por anaerobiose. A enzima DraG é encontrada na fração de membrana durante preparações celulares em larga escala, condições onde as células são submetidas à anaerobiose durante a preparação e em que a proteína NifH é encontrada modificada (LJUNGSTROM *et al.*, 1989). Portanto, é bem provável que a proteína DraG também seja regulada negativamente por associação com a membrana durante o desligamento da nitrogenase induzido por anaerobiose. Neste caso, a via de ligação à membrana não envolveria as proteínas GlnB, GlnZ e AmtB uma vez que os respectivos mutantes apresentam um perfil de modificação da proteína NifH semelhante ao observado na estirpe selvagem frente à anaerobiose (Figura 39).

Figura 50 – Modelo para regulação das atividades das enzimas DraT e DraG em resposta a adição de amônio em *A. brasilense*.



(A) Em condições de fixação de nitrogênio as proteínas PII, GlnB e GlnZ, estão completamente uridiladas e localizam-se no citoplasma, DraG também está no citoplasma em um complexo com a forma uridilada de GlnZ. Nestas condições, DraG está ativa e DraT está inativa, portanto, NifH não está modificada permitindo a fixação biológica de nitrogênio. (B) O aumento nos níveis de amônio extracelular faz com que GlnB e GlnZ sejam desuridiladas. A forma desuridilada de GlnB liga-se à enzima DraT, ativando-a. NifH é então modificada e a atividade da enzima nitrogenase é desligada. Ao mesmo tempo, a desuridilação de GlnZ faz com que o complexo DraG/GlnZ se associe a proteína de membrana AmtB. A ligação de DraG à membrana potencialmente separa a enzima DraG de seu substrato citoplasmático NifH ADP-ribosilada inibindo a remoção do grupo ADP-ribose.

7. CONCLUSÕES

1. A expressão do gene *glnB* de *A. brasilense* é regulada pela proteína NtrC, sendo que a proteína NtrC atua como repressora do promotor *glnBp1* - σ^{70} e como ativadora do promotor *glnBp2* - σ^N .
2. A troca dos resíduos G238E e G240D na proteína NtrC de *A. brasilense* gera formas repressoras da proteína NtrC capazes de ligar ao DNA mas incapazes de ativar transcrição de promotores σ^N . Estas mutações explicam as bases moleculares para os fenótipos Nif⁻ e Nar⁻ observados nas estirpes FP8 e FP9.
3. A ADP-ribosilação da proteína NifH em resposta a amônio é alterada quando as enzimas DraG e DraT são superexpressas separadamente, porém a regulação normal é re-estabelecida quando DraT e DraG são superexpressas simultaneamente.
4. As proteínas GlnB e GlnZ se ligam à fração de membrana de forma reversível e AmtB-dependente após um choque de amônio.
5. A proteína AmtB é necessária para a ADP-ribosilação da proteína NifH em resposta a adição de amônio, mas não para a modificação induzida por anaerobiose.
6. A atividade da enzima DraG é controlada possivelmente por ligação reversível à membrana induzida por amônio de forma dependente de AmtB e GlnZ através de um complexo ternário DraG/GlnZ/AmtB.
7. A enzima DraT interage fisicamente com a forma desuridilada de GlnB sugerindo que a interação DraT/GlnB resulte na ativação de DraT após um choque de amônio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, S. P.; PURICH, D.; STADTMAN, E. R. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the pII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylylremoving enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 6264-6272, 1975.
- ANDRADE, S.L.A.; DICKMANN, A.; FICNER, R.; EINSLE, O. Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 14994-14999, 2005.
- ANTHARAVALLY, B. S.; POYNER, R. R.; ZHANG, Y.; ROBERTS, G. P.; LUDDEN, P. W. Effects of specific amino acid substitutions on activities of dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase from *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.** V. 183, p. 5743-5746, 2001.
- ARAUJO, M. S.; BAURA, V. A.; SOUZA, E. M.; BENELLI, E. M.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. In vitro uridylylation of the *Azospirillum brasilense* N-signal transducing GlnZ protein. **Prot. Express. Purif.** V. 33, p. 19-24, 2004.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 65, p. 80-105, 2001.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol.** v. 178, p. 4830-4838, 1996.
- ASHBY, G.A.; THORNELEY, R. N. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Kinetic studies on the Fe protein involving reduction by sodium dithionite, the binding of MgADP and a conformation change that alters the reactivity of the 4Fe-4S center. **Biochem. J.** v. 246, p. 455-465, 1987.
- ASSUMPÇÃO, M. C. **Contribuição para o entendimento da função do operon *ntrYX* de *Azospirillum brasilense***. Curitiba, 2002. 81p. Tese (Mestrado em bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2002.
- ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; WEISS, R. L.; NINFA, A. J. Reversible Uridylylation of the *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Regulates Its Ability to Stimulate the Dephosphorylation of the Transcription Factor Nitrogen Regulator I (NRI or NtrC). **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28288-28293, 1994.
- ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. Role of the GlnK transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v. 29, p. 431-447, 1998.
- ATKINSON, M.R.; BLAUWKAMP, T.A.; NINFA, A.J. Context-dependent functions of the PII and GlnK signal transduction proteins in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** v.184, p. 5364-5375, 2002.

- AUSTIN, S.; HENDERSON, N.; DIXON, R. Characterisation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen-fixation regulatory proteins NIFA and NIFL *in vitro*. **Eur. J. Biochem.** v. 187, p. 353-360, 1990.
- AUSTIN, S.; KUNDROT, C.; DIXON, R. Influence of a mutation in the putative nucleotid binding site of the nitrogen regulatory protein NtrC on its positive control functions. **Nucleic. Acids. Res.** v. 11, p. 2281-2287, 1991.
- BARRIOS, H.; VALDERRAMA, B.; MORETT, E. Compilation and analysis of σ^{54} - dependent promoter sequences. **Nucleic. Acids. Res.** v. 27, p. 4305-4313, 1999.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Can. J. Microbiol.** v. 43, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Can. J. Microbiol.** v. 50, p. 521-577, 2004.
- BECKER, D.; STANKE, R.; FENDRIK, I.; FROMMER, W. B.; VANDERLEYDEN, J.; KAISER, W. M.; HEDRICH, R. Expression of the NH_4^+ transporter gene LEAMT1;2 is induced in tomato roots upon association with N_2 -fixing bacteria. **Planta.** v. 215, p. 424-429, 2002.
- BLAUWKAMP, T.A.; NINFA, A.J. Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. **Mol. Microbiol.** v. 46, p. 203-214, 2002.
- BLOOM, F. R.; LEVIN, M. S.; FOOR, F.; TYLER, B. Regulation of glutamine synthetase formation in *Escherichia coli*: characterization of mutants lacking the uridylyltransferase. **J. Bacteriol.** v. 134, p. 569-577, 1978.
- BORGHESE, R.; WALL, J.D. Regulation of the *glnBA* operon of *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.** v. 177, p. 4549-4552, 1995.
- BOZOUKLIAN, H.; ELMERICH, C. Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp7 glutamine synthetase structural gene. **Biochimie.** v. 68, p. 1181-1187, 1986.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v.72, p. 248-254, 1976.
- BROWN, M. S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E. R. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the pII-regulatory protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 68, p. 2949-2953, 1971.
- BUCK, M. Deletion analysis of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter: importance of spacing between conserved sequences around positions –12 and –24 for activation by the *nifA* and *ntrC* (*glnG*) products. **J. Bacteriol.** v. 166, p. 545-551, 1986.
- BUCK, M.; GALLEGOS, M.; STUDHOLME, D.; GUO, Y.; GRALLA, J. D. The bacterial enhancer-dependent σ^{54} (σ^N) transcription factor. **J. Bacteriol.** v. 182, p. 4129-4136, 2000.

BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *E. coli* **J.Bacteriol.** v.164, p. 816-822, 1985.

BURNETTE, W. "Western Blotting": Eletrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.** v. 112, p. 195-203, 1981.

BURRIS, R. H. Nitrogenases. **J. Biol. Chem.** v. 266, p. 9339-9342, 1991.

CARR, P.D.; CHEAH, E.; SUFFOLK, P.M.; VASUDEVAN, S.G.; DIXON, N.E.; OLLIS, D.L. X-ray structure of the signal transduction protein P_{II} from *Escherichia coli* at 1.9Å. **Acta Cryst.** v. 52, p. 93-104, 1996.

CHAMBREY, R.; GOOSSENS, D.; BOURGEOIS, S.; PICARD, N.; BLOCH-FAURE, M.; LEVIEL, F.; GEOFFROY, V.; CAMBILLAU, M.; COLIN, Y.; PAILLARD, M.; HOUILLIER, P.; CARTRON, J.P.; ELADARI, D. Genetic ablation of Rhbg in the mouse does not impair renal ammonium excretion. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v. 289, p. F1281-F1290, 2005.

CHEEMA, A. K.; CHOUDHURY, N. R.; DAS, H. K. A- and T- tract-mediated intrinsic curvature in native DNA between the binding site of the upsteram activator NtrC and the *nifLA* promoter of *Klebsiella pneumoniae* facilitates transcription. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 5296-5302, 1999.

CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, X.; ELMERICH, C.; JI-LUN, L. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr - Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Mol. Genet. Genomics.** V. 273, p. 415-422, 2005.

CHENG, J.; JOHANSSON, M.; NORDLUND, S. Expression of PII and glutamine synthetase is regulated by PII the *ntrBC* products, and processing of the *glnBA* mRNA in *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 6530-6534, 1999.

CHEREPANOV, P. P.; WACKERNAGEL, W. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. **Gene.** v. 158, p. 9-14, 1995.

CORMACK, B. Mutagenesis of cloned DNA, In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (eds.). **Short protocols in molecular biology.** New York: John Wiley & Sons, Inc., 1992.

COUTTS, C.; THOMAS, G.; BLAKEY, D. MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J.** v. 21, p. 536-545, 2002

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proc Natl Acad Sci. USA.** v. 97, p. 6640-6645, 2000.

- DE ZAMAROCZY, DELORM, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. **Mol. Gen. Genet.** v. 224, p. 421-430, 1990.
- DE ZAMAROCZY, M. Structural homologues P_{II} and P_Z of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signaling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Mol. Microbiol.** v. 29, p. 449-463, 1998.
- DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v. 178, p. 4143-4149, 1996.
- DE ZAMAROCZY, PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Function organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v. 175, p. 2507-2515, 1993.
- deHASETH, P.L.; ZUPANCIC, M. L.; RECORD Jr., T.M. RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polimerase. **J. Bacteriol.** v. 180, p. 3019-3025, 1998.
- DEKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Comglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., elevation of *Comglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Comglomeromonas*, *Comglomeromonas parooensis* sp. nov. **System. Appl. Microbiol.** v. 20, p. 72-77, 1997.
- DETSCH, C., STULKE, J. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. **Microbiology.** v.149, p. 3289-3297, 2003.
- DILWORTH, M. J.; Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum* . **Bioch. Biophys. Acta.** v. 127, p.285-294, 1966.
- DIXON, R. Tandem promoters determine regulation of the *Klebsiella pneumoniae* glutamine synthetase (*glnA*) gene. **Nucl. Acids Res.** v. 12, p. 7811-7830, 1984.
- DIXON, R; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews.** v. 2, p. 621-631, 2004
- DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In BALLOWS, A., TRUPPER, H.G., DWORKING, M., HARDER, W. (Ed.). **The Prokaryotes.** 2.ed., v. 3., p.2236-3353, 1991.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E. e NYMAN, C. J. (Ed.) **Proceedings of the 1st. Intl. Symp. Nitrogen Fixation.** v. 2 Pullman, Washington Univ. Press. p. 518-38, 1976.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants.** Science Tech Publishers/Springer-Verlag, 1987.

DREPPER, T.; GROB, S.; YAKUNIN, A. F. MASEPOHL, B.; KLIPP, W. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**. v. 149, p. 2203-2212, 2003.

EADY, R. R. Enzymology in free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W. J.; PUHLER, S. (Ed.) **Nitrogen Fixation**, v.4, p.1-49, 1986.

ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 51, p.17-26, 2001.

EGENER, T; MARTIN, D. E.; SARKAR, A.; REINHOLD-HUREK, B. Role of a Ferredoxin Gene Cotranscribed with the *nifHDK* Operon in N₂ Fixation and Nitrogenase "Switch-Off" of *Azoarcus* sp. Strain BH72. **J. Bacteriol**. v. 183, p. 3752-3760, 2001.

ENGLEMAN, E. G., FRANCIS, S. H. Cascade control of glutamine synthetase. II. Metabolic regulation of the enzymes in the cascade. **Arch. Biochem. Biophys**. v. 191, p. 602–612, 1978.

ERCOLANO, E.; MIRABELLA, R.; MERRICK, M.; CHIURAZZI, M. The *Rhizobium leguminosarum glnB* is down-regulated during symbiosis. **Mol. Gen. Genet**. v. 264, p. 555-564, 2001.

FADEL-PICHETH, C.M.T.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F.O. Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiol. Lett**. v. 179, p. 281-288, 1999.

FLASHNER, Y.; WEISS, D. S.; KEENER, J.; KUSTU, S. Constitutive forms of the enhancer-binding protein NtrC: evidence that essential oligomerization determinants lie in the central activation domain. **J. Mol. Biol**. v. 249, p. 700-713, 1995.

FOSTER-HARTNETT, D.; KRANZ, R.G. The *Rhodobacter capsulatus glnB* gene is regulated by NtrC at tandem *rpoN*-independent promoters. **J. Bacteriol**. v. 176, p. 5171-5176, 1994.

GARCIA, E.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 2246-2253, 1983.

FU, H. A.; HARTMANN, A.; LOWERY, R. G.; FITZMAURICE, W. P.; ROBERTS, G. P.; BURRIS, R. H. Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol**. v. 171, p. 4679-85, 1989.

GRALLA, J. D. Opening promoters for m-RNA transcription. **Cell. Mol. Biol. Res**. v. 39, p. 319-322, 1993.

GRUNWALD, S. K.; LIES, D. P.; ROBERTS, G. P.; LUDDEN, P. W. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodospirillum rubrum* strains overexpressing the regulatory

enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase activating glycohydrolase. **J. Bacteriol.** v. 177, p. 628-635, 1995.

GRUNWALD, S. K.; LUDDEN, P. W. NAD-dependent cross-linking of dinitrogenase reductase and dinitrogenase ADP-ribosyltransferase from *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.** v. 179, p. 3277-3283, 1997.

GUST, B., CHALLIS, G. L., FOWLER, K., KIESER, T., CHATER, K. F. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. **Proc Natl Acad Sci. USA.** v.100, p. 1541-1546, 2003.

HACKETTE, S.L.; SKYE, G.E.; BURTON, C.; SEGEL, I.H. Characterization of an ammonium transport system in filamentous fungi with [¹⁴C]-methylammonium as the substrate. **J. Biol. Chem.** v. 245, p. 4241-4250, 1970.

HAGEMAN, R.V.; BURRIS, R.H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 75, p. 2699-2702, 1978.

HALBLEID, C. M.; LUDDEN, P. W. Characterization of the interaction of dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase from *Rhodospirillum rubrum* with bacterial membranes. **Arch. Microbiol.** v. 172, p. 51-58, 1999.

HALBLEID, C. M.; ZHANG, Y.; LUDDEN, P. W. Regulation of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase by a redox-dependent conformational change of nitrogenase. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 3493-3500, 2000b.

HALBLEID, C. M.; ZHANG, Y.; ROBERTS, G. P.; LUDDEN, P. W. Effects of Perturbations of the Nitrogenase Electron Transfer Chain on Reversible ADP-Ribosylation of Nitrogenase Fe Protein in *Klebsiella pneumoniae* Strains Bearing the *Rhodospirillum rubrum* *dra* Operon. **J. Bacteriol.** v. 182, p. 3681-3687, 2000a.

HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.** v. 165, p. 864-870, 1986.

HO, Y.S.; BURDEN, L.M.; HURLEY, J.H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **EMBO J.** v. 19, p. 5288-5299, 2000.

HUERGO, L.F.; NOINDORF, L.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Partial cloning of the ammonium transporter genes of *Azospirillum brasilense* and *herbaspirillum seropedicae*. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity.** 127p., 1999.

HUERGO, L. F. **Caracterização da região promotora do operon *glnBA* de *Azospirillum brasilense*.** Curitiba, 2002. 94p. Tese (Mestrado em bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2002.

HUERGO, L. F., FILIPAKI, A., CHUBATSU, L. S, YATES, M. G., PEDROSA, F. O. SOUZA, E. M. Effects of the PII and PZ proteins over-expression in the nitrogen metabolism of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.** V. 253, p. 47-54, 2005.

ISHIDA, M.L.; ASSUMPCAO, M.C.; MACHADO, H.B.; BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. **Braz. J Med. Biol. Res.** v. 35, p.651-661, 2002.

JACK, R.; DE ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.** v.181, p. 1156-1162, 1999.

JAVELLE, A.; SEREVI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium sensing in *E. coli*: the role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 8530-8538, 2004.

JAVELLE, A.; THOMAS, G.; MARINI, A.M.; KRAMER, R.; MERRICK, M. *In vivo* functional characterisation of the *E. coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. **Biochem. J.** v. 390, p. 215-222, 2005.

JIANG, P.; NINFA, A. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 1906-1911, 1999.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli*. **Biochemistry.** v. 37, p. 12782-12794, 1998a.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Reconstitution of the signal-transduction bicycle cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. **Biochemistry.** v. 37, p. 12795-12801, 1998b.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylation state. **Biochemistry.** v. 37, p. 12802-12810, 1998c.

JIANG, P.; ZUCKER, P.; NINFA, A.J. Probing interactions of the homotrimeric PII signal transduction protein with its receptors by use of PII heterotrimers formed in vitro from wild-type and mutant subunits. **J. Bacteriol.** v. 179, p. 4354-4360, 1997.

JOHANNSON, M.; NORDLUND, S. Transcription of the *glnB* and *glnA* genes in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology.** v. 142, p. 1265-1272, 1996.

JOUANNEAU, Y.; C. M. MEYER; P. M. VIGNAIS. Regulation of nitrogenase activity through iron protein interconversion into an active and inactive for in *Rhodopseudomonas capsulata*. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 749, p. 318-328, 1983.

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 17797-17807, 1995.

KANEMOTO, R. H.; LUDDEN, P. W. Effect of ammonium, darkness, and phenazine methosulfate on whole-cell nitrogenase activity and Fe protein modification in *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.** v. 158, p. 713-720, 1984.

KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum brasilense* inoculation. **Can. J. Microbiol.** v. 31, p. 881-887, 1985.

KEENER, J.; KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 85, p. 4976-4980, 1988.

KHADEMI, S.; O'CONNELL, J.I.; REMIS, J.; ROBLES-COLMENARES, Y.; MIERCKE, L.J.; STROUD, R.M. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. **Science.** v. 305, p.1587-1594, 2004.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.** v. 140, p. 679-694, 1989.

KLASSEN, G., SOUZA, E. M., YATES, M. G., RIGO, L. U., COSTA, R. M., INABA, J., PEDROSA, F. O. Nitrogenase switch-off by ammonium ions in *Azospirillum brasilense* requires the GlnB nitrogen signal transducing protein. **App. Env. Microbiol.** v. 71, p. 5637-5641, 2005.

KLASSEN, G.; SOUZA, E.M.; YATES, M. G.; RIGO, L.U.; INABA, J.; PEDROSA, F.O. Control of nitrogenase reactivation by the GlnZ protein in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v.183, p. 6710-6713, 2001.

KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 32, p. 87-100, 1985.

KLEINER, D.; PAUL, W.; MERRICK, M. Construction of multicopy expression vectors for regulated over production of protein in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. **J. Gen. Microbiol.** v. 134, p. 1779-1784, 1988.

KLOPPROGGE, K.; GRABBE, R.; HOPPERT, M.; SCHIMITZ, R. A. Membrane association of *Klebsiella pneumoniae* NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. **Arch. Microbiol.** v. 177, p. 223-234, 2002.

KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In BROWN, T. A., **Essential Molecular Biology: A Practical Approach**, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.

KRANZ, R. G.; PACE, V. M.; CALDICOTT, I.M. Inactivation, sequence, and lacZ fusion analysis of a regulatory locus required for repression on nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.** v. 172, p. 53-62, 1990.

KUSTU, S.; HIRSCHMAN, J.; BURTON, D.; JELESKO, J.; MEEKS, J.C. Covalent modification of bacterial glutamine synthetase: physiological significance. **Mol. Gen. Genet.** v. 197, p. 309-317, 1984.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature.** v. 227, p. 680-685, 1970.

LI, J.; PASSAGLIA, L.; ROMBEL, I.; YAN, D.; KUSTU, S. Mutations affecting motifs of unknown function in the central domain of the nitrogen regulatory protein C. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 5443-5454, 1999.

LIANG, J. H.; NIELSEN, G. M.; LIES, D. P.; BURRIS, R. H.; ROBERTS, G. P.; LUDDEN, P. W. Mutation in the *draT* and *draG* genes of *Rhodospirillum rubrum* result in loss of regulation of nitrogenase by reversible ADP-ribosylation. **J. Bacteriol.** v. 173, p. 6903-6909, 1991.

LIANG, Y. Y.; ARSENE, F.; ELMERICH, C. Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* Sp7: their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. **Mol. Gen. Genet.** v. 240, p.188-196, 1993.

LIANG, Y.Y.; DE ZAMAROCZY, M.; ARSENE, F.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 79, p. 113-119, 1992.

LISSER, S.; MARGALIT, H. Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. **Nucleic Acids Res.** v. 21, p. 1507-1516, 1993.

LJUNGSTROM, E.; YATES, M. G.; NORDLUND, S. Purification of the activating enzyme for the Fe-protein of nitrogenase from *Azospirillum brasilense*. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 994, p. 210-214, 1989.

LONETO, M.; GRIBSKOV, M.; GROSS, C. The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. **J. Bacteriol.** v. 174, p. 3843-3849, 1992.

LOWE, D. J.; FISHER, K.; THORNELEY, R. N. *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase: pre-steady-state absorbance changes show that redox changes occur in the MoFe protein that depend on substrate and component protein ratio; a role for P-centres in reducing dinitrogen? **Biochem. J.** v. 292, p. 93-98, 1993.

LOWERY, R. G., L. L. SAARI; P. W. LUDDEN. Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-ribosylation in vitro. **J. Bacteriol.** v. 166, p. 513-518, 1986.

- LOWERY, R. G.; LUDDEN, P. W. Purification and properties of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Biol. Chem.** v. 263, p. 16714-16719, 1988.
- MACHADO, H. B. **Organização estrutural e regulação do operon ORF1-*ntrB*-*ntrC* em *Azospirillum brasilense***. Curitiba, 1995. Tese (Doutorado em bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1995.
- MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Can. J. Microbiol.** v. 37, p. 549-553, 1991.
- MACHADO, H. B.; YATES, M.G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F. O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3-like-ntrB-ntrC* operon and are negatively regulated. **Can. J. Microbiol.** v. 41, p. 674-684, 1995.
- MAGALHAES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **An. Acad. Bras. Ciên.** v. 55, p. 471-430, 1983.
- MARINI, A.M.; MATASSI, G.; RAYNAL, V.; ANDRE, B.; CARTRON, J.P.; CHERIF-ZAHAR, B. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. **Nat. Genet.** v. 26, p. 341-344, 2000.
- MARINI, A.M.; VISSERS, S.; URRESTARAZU, A.; ANDRE, B. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.** v. 13, p. 3456-3463, 1994.
- MARTIN, D. E.; REINHOLD-HUREK, B. Distinct roles of PII-like signal transmitter proteins and *amtB* in regulation of *nif* gene expression, nitrogenase activity, and postranslational modification of NifH in *Azoarcus* sp. strain BH72. **J. Bacteriol.** v. 184, p. 2251-2259, 2002.
- MARTIN, G.B.; THOMASHOW, M.F.; CHELM, B.K.; *Bradyrhizobium japonicum glnB*, a putative nitrogen-regulatory gene, is regulated by NtrC at tandem promoters. **J. Bacteriol.** v. 171, p. 5638-5645, 1989.
- MARTIN-DIDONET, C.C.G.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E.M.; KLEINA, M.; REGO, F.G.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Characterization of the genomic structure of the genus *Azospirillum*. **J. Bacteriol.** v. 182, p. 4113-4116, 2000.
- MEAD, D. A.; SZCZENA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. Single strand DNA “blue”T7 promoter plasmids a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. **Prot. Eng.** v.1, p. 67-74, 1986.
- MERRICK, M. J. In a class of its own – the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). **Mol. Microbiol.** v.10, p. 903-909, 1993.

MERRICK, M. J. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological nitrogen fixation**. p. 835-876, 1992.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Rev.** v. 59, p. 604-622, 1995.

MERRICK, M.J. Nitrogen control of nitrogen fixation in free-living diazotrophs, In: KLIPP, W.; MASEPOHL, B.; GALLON, J.R.; NEWTON, W.E. **Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria**. Amsterdam, p. 97-223, 2004.

MICHEL-REYDELLET, N.; DESNOUES, N.; ELMERICH, C.; KAMINSKI, P. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* *glnB* and *glnA* genes: involvement of PII protein in symbiotic nitrogen fixation. **J. Bacteriol.** v. 179, p. 3580-3587, 1997.

MILCAMPS, A.; VAN DOMMELEN, A.; STIGER, J.; VANDERLEYDEN, J.; DE BRUJIN F.J. The *Azospirillum brasilense* *rpoN* gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake and flagellar biosynthesis. **Can. J. Microbiol.** v. 258, p. 671-677, 1996.

MILLER, J.H. **A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria**. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 456p, 1992.

MONTEIRO, R.A.; PEDROSA, F.O.; STEFFENS, M.B.R.; CHUBATSU, L.S. Isolation of recombinant plasmids for rapid analysis using a sodium dodecyl sulfate/potassium chloride precipitation. **Anal. Biochem.** v. 291, p. 1-2, 2001.

MURO-PASTOR, A.M.; OSTROVSKY, P.; MALOY, S. Regulation of gene expression by repressor localization: biochemical evidence that membrane and DNA binding by the PutA protein are mutually exclusive. **J. Bacteriol.** v. 179, p. 2788-2791, 1997.

NEUWALD, A.F.; ARAVIND, L.; SPOUGE, J.L.; KOONIN, E.V. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. **Genome Res.** v. 9, p. 27-43, 1999.

NINFA, A. J.; BENNETT, R. L. Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NRII. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 6888-6893, 1991.

NINFA, A.J.; JIANG, P. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 8, p. 168-173, 2005.

NINFA, E. G.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; NINFA, A. J. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. **J. Bacteriol.** v. 175, p. 7024-7032, 1993.

NINNEMANN, O.; JAUNIAUX, J.C.; FROMMER, W.B. Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. **EMBO J.** v. 13, p. 3464-3471, 1994.

- NORDLUND, S.; ERIKSSON, U.; BALTSCHIEFFSKY, H. Necessity of a membrane component for nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 462, p. 187-195, 1977.
- NORDLUND, S.; Regulation of nitrogenase activity in phototrophic bacteria by reversible covalent modification. **Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of a biological process.** Horizon Scientific Press, 2000.
- NORÉN, A.; NORDLUND, S. Dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase can be released from chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* by treatment with MgGDP. **J. Bacteriol.** v. 179, p. 7872-7874, 1997.
- NORTH, A. K.; WEISS, D. S.; SUZUKI, H.; FLASHNER, Y.; KUSTU, S. Repressor forms of the enhancer-binding protein NtrC: some fail in coupling ATP hydrolysis to open complex formation by σ^{54} – holoenzyme. **J. Mol. Biol.** v. 260, p. 317-331, 1996.
- PAWLOWSKI, A.; RIEDEL, K.; KLIPP, W.; DREISKEMPER, P.; GROB, S.; BIERHOFF, H.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B. Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.** v. 185, p. 5240-5247, 2003
- PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; DE BRUIJN, F. J. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component system. NtrY-NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. **Mol. Gen. Genet.** v. 231, p. 124-138, 1991.
- PEDROSA, F.O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil idéia. **Ciência hoje**, v. 6, p.12-13, 1987.
- PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) type genes. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 55, p. 95-101, 1984.
- PERSUHN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 192, p. 217-221, 2000.
- POPE, M.R.; MURREL, S.A.; LUDDEN, P.W. Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by adenosine diphosphorylation of a specific arginyl residue. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 82, p. 3173-3177, 1985.
- PORTER, S.C.; NORTH, A.K.; KUSTU, S. Mechanism of the transcription activation by NtrC. In: HOCH, J, A.; SILHAVY, T.J. (Ed.). **Two-component signal transduction.** ASM Press. Washington D.C., 1995.
- POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation.** Cambridge, Cambridge Univ. Press. 252p, 1982.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca*) **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 37, p. 43-51, 1987.

REITZER, L.; SCHNEIDER, B.L. Metabolic context and possible physiological themes of sigma 54 – dependent genes in *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 63, p. 422-444, 2001.

REITZER, L.J.; MAGASANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 82, p. 1979-1983, 1985.

REYES-RAMIREZ, F.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of *Escherichia coli* nitrogen regulatory genes in the nitrogen response of the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA complex. **J. Bacteriol.** v. 183, p. 3076-3082, 2001.

RIPOCHE, P.; BERTRAND, O.; GANE, P.; BIRKENMEIER, C.; COLIN, Y.; CARTRON, J.P. Human Rhesus-associated glycoprotein mediates facilitated transport of NH₃ into red blood cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** v. 101, p. 17222-17227, 2004.

RIPPE, K.; MUCK, N.; SCHULZ, A. Association states of the transcription activator protein NtrC from *Escherichia coli* determined by analytical centrifugation. **J. Mol. Biol.** v. 278, p. 915-933, 1998.

ROMBEL, I.; PETERS-WENDISCH, P.; MESECAR, A.; THORGEIRSSON, T.; SHIN, Y.; KUSTU, S. MgATP binding and hydrolysis determinants of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 4628-4638, 1999.

SAARI, L.L.; TRIPLETT, E. W.; LUDDEN, P. W. Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Biol. Chem.** v. 259, p. 15502-15508, 1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2 ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SARASTE, M.; SIBBALD, P.R.; WITTINGHOFFER, A. The P-loop, a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. **Trends. Biochem. Sci.** v. 15, p. 430-434, 1990.

SCHINDELIN, H.; KISKER, C.; SCHLESSMAN, J.L.; HOWARD, J.B.; REES, D.C. Structure of ADP x AIF4(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. **Nature.** v. 22, p. 370-376.

SCHNEIDER, B. L.; SHIAU, S. P.; REITZER, L. J. Role of multiple environmental stimuli in control of transcription from nitrogen-regulated promoter in *Escherichia coli* with weak or no activator-binding sites. **J. Bacteriol.** v. 173, p. 6355-6363, 1991.

- SCHOLLHORN, R.; BURRIS, R. H. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 58. p. 213-216, 1967.
- SENIOR, P.J. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous culture technique. **J. Bacteriol.** v. 123, p. 407-410, 1975.
- SHAPIRO, L.; LOSICK, R. Dynamic spatial regulation in the bacterial cell. **Cell.** v.100, p. 89-98, 2000.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **BioTechnology.** v.1, p. 784-791, 1983.
- SOUPENE, E.; HE, L.; YAN, D.; KUSTU, S. Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 95, p. 7030-7034, 1998.
- SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L. U.; YATES, M. G.; Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 681-684, 1999.
- SPAINK, H.P.; OKKER, R.J.H.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B.J.J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRLIJ. **Plant Mol. Biol.** v. 9, p. 27-39, 1987.
- STEENHOUD, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 24, p. 487-506, 2000.
- STROSSER, J., LUDKE, A., SCHAFFER, S., KRAMER, R., BURKOVSKI, A. Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. **Mol Microbiol.** v. 54, p.132-147, 2004.
- SU, W.; PORTER, S.; KUSTU, S.; ECHOLS, H. DNA looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 87, p. 5504-5508, 1990.
- TANAKA, Y.; KIMATA, K.; AIBA, H. A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor MLC. **EMBO J.** v. 19, p. 5344-5352, 2000.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, J. Ataxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can. J. Microbiol.** v. 24, p. 967-980, 1978.

THOMAS, G.; COUTTS, G.; MERRICK, M. The *glnKamtB* operon a conserved gene pair in prokaryotes. **Trends Genet.** v. 16, p.11-14, 2000a.

THOMAS, G.H.; MULLINS, J.G.; MERRICK, M. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. **Mol. Microbiol.** v. 37, p. 331-344, 2000b.

TIAN, Z.; LI, Q.; BUCK, M.; KOLB, A.; WANG, Y. The CRP-cAMP complex and downregulation of the *glnAp2* promoter provides a novel regulatory linkage between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v. 41, p. 911-924, 2001.

TINTUT, Y.; GRALLA, J.D. PCR mutagenesis identifies a polymerase-binding sequence of sigma 54 that includes a sigma 70 homology region. **J. Bacteriol.** v. 177, p. 5818-5825, 1995.

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J. Cloning and characterization of the *Azospirillum brasilense glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. **Mol. Gent. Genomics.** v. 5, p. 813-820, 2002.

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **J.Bacteriol.** v. 180, p. 2652-2659, 1998.

VAN HEESWIJK, W. C.; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v. 21, p. 133-146, 1996.

VAN HEESWIJK, W. C.; WEN, D.; CLANCY, P.; JAGGI, R.; OLLIS, D.L.; WESTERHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S.G. The *Escherichia coli* transducers PII (GlnB) and GlnK form heterotrimers in vivo: fine tuning the nitrogen signal cascade. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 97, p. 3942-3947, 2000.

VITORINO, J. C.; STEFFENS, M. B. R.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Potential roles for the *glnB* and *ntrYX* genes in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 201, p. 199-204, 2001.

VON WIRÉN, N.; MERRICK, M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. **Trends in Current Genetics.** v. 9, p. 95-120, 2004.

WANG, H.; FRANKE, C. C.; NORDLUND, S.; NOREN, A. Reversible membrane association of dinitrogenase reductase activating glycohydrolase in the regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*; dependence on GlnJ and AmtB1. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 253, p. 273-279. 2005.

WEI, G. R.; KUSTU, S. Glutamine auxotrophs with mutations in a nitrogen regulatory gene, *ntrC*, that is near *glnA*. **Mol. Gen. Genet.** v. 183, p. 393-399, 1981.

WEISS, D. S.; BATUT, J.; KLOSE, K.E.; KEENER, J.; KUSTU, S. The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NtrC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. **Cell.** v. 67, p. 155-167, 1991.

WEISS, V.; MAGASANIK, B. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 85, p. 8919-8923, 1988.

WESTBY, C. A.; ENDERLIN, C. S.; STEINBERG, N. A.; JOSEPH, C. M.; MEEKS, J. C. Assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **J. Bacteriol.** v. 169, p. 4211-4214, 1987.

WIDDICK, D.; FAREZ-VIDAL, E.; AUSTIN, S.; DIXON, R. Properties of a mutant form of the prokaryotic enhancer binding protein, NTRC, which hydrolyses ATP in the absence of effectors. **FEBS Lett.** v. 437, p. 70-74, 1998.

WOSTEN, M.M.S.M. Eubacterial sigma-factors. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 22, p. 127-150, 1998.

XIE, C.H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 55, p. 1435-1438, 2005.

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P.D.; VAN HEESWIJK, W.C.; WESTERHOFF, H.V.; VASUDEVAN, S.G.; OLLIS, D.L. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **J Mol. Biol.** v. 282, p. 149-165, 1998.

YAKUNIN, A. F.; HALLENBECK, P. C. AmtB is necessary for NH_4^+ induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.** v. 184, p. 4081-4088, 2002.

YAN, D.; KUSTU, S. "Switch I" mutant forms of the bacterial enhancer-binding protein NtrC that perturb the response to DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 96, p. 13142-13146, 1999.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In STALEY, G.; BURRIS, R. M.; EVANS, M. S. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation.** New York. 943p. 1992.

ZHANG, Y., BURRIS, R. H., LUDDEN, P. W., ROBERTS, G. P. Comparison studies of dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase / dinitrogenase reductase activating glycohydrolase regulatory systems in *Rhodospirillum rubrum* and *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v.177, p. 2354-2359, 1995.

ZHANG, Y., R. H. BURRIS, P. W. LUDDEN, G. P. ROBERTS. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v. 175, p. 6781-6788, 1993.

ZHANG, Y.; BURRIS R. H.; ROBERTS G. P. Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v. 174, p. 364–3369, 1992.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense ntrBC* mutants: ammonium and anaerobic switch-off occurs through independent signal transduction pathways. **J. Bacteriol.** v. 176, p. 5780-5787, 1994.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Presence of a second mechanism for the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* in response to ammonium. **J. Bacteriol.** v. 178, p. 2948-2953, 1996.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 152, p.195-204, 1997.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA* and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.** v. 182, p. 983-992, 2000.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E.L.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P.; Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. **J. Bacteriol.** v. 183, p. 6159-6168, 2001.

ZHENG, L.; KOSTREWA, D.; BERNÈCHE, S.; WINKLER, F.K.; LI, X.D. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *E. coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 101, p. 17090-17095, 2004.

ZHU, Y.; CONRAD, M. C.; ZHANG, Y.; ROBERTS, G. P. Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB variants that are altered in their ability to interact with different targets in response to nitrogen status signal. **J. Bacteriol.** v. 188, p. 1866-1874, 2006.

ZINCHENKO, V.; CHURIN, Y.; SHESTOPALOV, V.; SHESTAKOV, S. Nucleotide sequence and characterization of *Rhodobacter sphaeroides glnB* and *glnA* genes. **Microbiology**, v.140, p. 2143-2151, 1994.

ZUMFT, W. G., F. CASTILLO. Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodopseudomonas palustris*. **Arch. Microbiol.** v. 117, p. 53–60, 1978.

